

<p>(51) 国際特許分類6 C07K 14/47, C12N 15/12, 1/21, 5/10, C12P 21/02, C12Q 1/68, C07K 16/18, G01N 33/15, 33/53, A61K 38/16, 48/00, 39/395</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/12550</p> <p>(43) 国際公開日 2000年3月9日(09.03.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04602</p> <p>(22) 国際出願日 1999年8月26日(26.08.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/241248 1998年8月27日(27.08.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 宮地宏昌(MIYAJI, Hiromasa)[JP/JP] 〒411-0945 静岡県駿東郡長泉町本宿234-16 Shizuoka, (JP) 三村英樹(MIMURA, Hideki)[JP/JP] 〒411-0945 静岡県駿東郡長泉町本宿151-1 Shizuoka, (JP) 神部素子(KAMBE, Motoko)[JP/JP] 〒411-0943 静岡県駿東郡長泉町下土狩1194-115 Shizuoka, (JP) 中川 智(NAKAGAWA, Satoshi)[JP/JP] 〒194-0021 東京都町田市市中町3-9-9 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に規則 1 3 の 2 に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。</p>	
<p>(54)Title: NOVEL POLYPEPTIDE</p> <p>(54)発明の名称 新規ポリペプチド</p> <p>(57) Abstract A novel transporter polypeptide; a DNA encoding this polypeptide; a vector containing this DNA; a transformant transformed by this vector; a process for producing the above transporter polypeptide; an antibody reacting specifically with the polypeptide; a microorganism, an animal cell or an animal producing this antibody; a method for searching for a compound having a ligand activity by using the polypeptide, a part thereof or a microorganism, an animal cell, etc. with the expression of the same; and a method for searching for a compound regulating the expression of the gene of the polypeptide by using cells.</p> <p style="text-align: center;">BEST AVAILABLE COPY</p>		

(57)要約

本発明は、新規トランスポーターポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAを含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体および該トランスポーターポリペプチドの製造方法に関する。また、本発明は該ポリペプチドと特異的に反応する抗体、該抗体を産生する微生物、動物細胞又は動物、および該ポリペプチドもしくはその一部又はそれらを発現した微生物もしくは動物細胞等を利用したリガンド活性を有する化合物を探索する方法および細胞を利用した該ポリペプチドの遺伝子発現を調節する化合物を探索する方法に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦
AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴ
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CR コスタ・リカ
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェッコ
DE ドイツ
DK デンマーク

DM ドミニカ
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE グルジア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GW ギニア・ビサウ
GR ギリシャ
HR クロアチア
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮
KR 韓国

KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン
LK スリ・ランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MA モロッコ
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノルウェー
NZ ニュージーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア

RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア
SL シェラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴ
TJ タジキスタン
TZ タンザニア
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダード・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
UZ 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴイエトナム
YU ニューゴスラビア
ZA 南アフリカ共和国
ZW ジンバブエ

明 細 書

新規ポリペプチド

技術分野

本発明は、新規トランスポーターポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAを含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体および該トランスポーターポリペプチドの製造方法に関する。また、本発明は該ポリペプチドと特異的に反応する抗体、該抗体を産生する微生物、動物細胞又は動物、および該ポリペプチドもしくはその一部又はそれらを発現した微生物もしくは動物細胞等を利用したリガンド活性を有する化合物を探索する方法および細胞を利用した該ポリペプチドの遺伝子発現を調節する化合物を探索する方法に関する。

背景技術

哺乳動物細胞は、アデノシン、シチジン、グアノシン、イノシン、チミジン、ウリジン等の生理的なヌクレオシド(nucleoside)の細胞への取り込みを Na^+ 依存性および Na^+ 非依存性の機構で行っていることが知られている [Drug Transport in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy, pp.403-451, Marcel Decker, New York (1995)、Biochim. Biophys. Acta., 1286, 153 (1996)]。

このような機構は新生経路(de novo pathway)を欠損した造血系細胞等において再利用経路(salvage pathway)によるヌクレオチドおよび核酸合成に必須であるばかりでなく、白血病やAIDS等の抗腫瘍、抗ウイルス治療に用いられる多くの細胞障害性ヌクレオシド誘導体の細胞への取り込みにも関与している [Nucleosides Nucleotides, 11, 903 (1992)、J. Antimicrobiol. Chemother., 32, Suppl. A, 133(1993)]。

さらにヌクレオシドトランスポート過程はアデノシンを介する種々の生理作用、具体的には、冠動脈血管拡張、腎血管収縮、神経伝達、血小板凝集、脂肪分解等においても重要な役割を果たしていることが報告されている [Prog.

Cardiovasc. Dis., 32, 73 (1989)、Purines in Cellular Signaling: Targets for New Drugs, Springer-Verlag, New York (1990)、Adenosine and Adenine Nucleotides: From Molecular Biology to Integrative Physiology, Kluwer Academic Publishers, Boston (1995))。

Na^+ 依存性のヌクレオシドトランスポーター(濃縮型ヌクレオシドトランスポーター)は、機能的に特殊化した細胞、例えば、腸および腎臓の上皮、脈絡膜叢、肝臓、マクロファージ、脾臓細胞あるいは白血病細胞等に発現が限局しており、原形質膜の Na^+ 濃度勾配により駆動され、ヌクレオシドを細胞内に取り込む

[Drug Transport in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy, pp.403-451, Marcel Decker, New York (1995)、Biochim. Biophys. Acta., 1286, 153 (1996)]。

一方、 Na^+ 非依存性ヌクレオシドトランスポーターは多くの細胞、組織に普遍的に発現しており、原形質膜を介したヌクレオシドの流出および流入の両方に関与しており拡散型ヌクレオシドトランスポーター(equilibrative nucleoside transporter; ENT)と呼ばれている。

ENTは阻害剤nitrobenzylthioinosine(NBMPR; 6-[(4-nitrobenzyl)thio]-9- β -D-ribofuranosylpurine)に対する感受性により、NBMPRに高親和性($K_d = 0.1 \sim 10 \text{ nM}$)を示すequilibrative sensitive(es)型トランスポーターと、低濃度(nMオーダー)のNBMPRでは阻害されず、高濃度(μM オーダー)で阻害されるequilibrative insensitive(ei)型トランスポーターの2種類に分類されている [Drug Transport in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy, pp.403-451, Marcel Decker, New York (1995)、Biochim. Biophys. Acta., 1286, 153 (1996)]。

es型のトランスポーターは、ジピリダモール(dipyridamole)やジラゼップ(dilazep)等の冠動脈血管拡張薬の薬理学的標的であることが知られている [Prog. Cardiovasc. Dis., 32, 73 (1989)、Purines in Cellular Signaling: Targets for New Drugs, Springer-Verlag, New York (1990)]。

ENTとしてこれまでに、ヒトおよびラットes型トランスポーターcDNA(そ

れぞれhENT1、rENT1)、ヒトおよびラット e i 型トランスポーター c D N A (それぞれhENT2、rENT2) のクローン化が報告されている [Nature Medicine, 3, 89 (1997)、J. Biol. Chem., 272, 28423 (1997)、J. Biol. Chem., 273, 5288 (1998)、Biochemical J., 328, 739 (1997)]。

これらの拡散型トランスポーターは、1 1 回膜貫通型の膜糖蛋白質であると推定されており、相互に相同性が認められる (hENT1とhENT2でアミノ酸レベルで約 6 0 % の一致、rENT1とrENT2でアミノ酸レベルで約 5 0 % の一致)。

hENT1は濃縮型トランスポーターcNT1 [J. Biol. Chem., 269, 17757 (1994)] や細菌のヌクレオシドトランスポーターnupC [Mol. Microbiol., 11, 1159 (1994)]、nupG [Eur. J. Biochem., 168, 385 (1987)] との有意な相同性は見出されていない。

一方、線虫 (Caenorhabditis elegans) のゲノムプロジェクトより見出された ZK809.4, F16H11.3にそれぞれアミノ酸レベルで 2 3 %、2 1 % の一致が認められた。また、酵母 (Saccharomyces cerevisiae) のFUN26と 2 0 % の一致が認められた。これらの蛋白質の機能は不明であるが対応する生物におけるヌクレオシドトランスポーターの可能性が指摘されている [Nature Medicine, 3, 89 (1997)]。

ENTには細胞、組織により不均一性 (heterogeneity) が認められることから、さらなるENTアイソフォームが存在している可能性が示唆されている [Biochim. Biophys. Acta., 1286, 153 (1996)]。

発明の開示

本発明は、ヌクレオシド等の分子を細胞内に輸送または細胞外に排出する新規トランスポーターポリペプチド、該トランスポーターポリペプチドをコードする D N A、該ポリペプチドを認識する抗体を利用し、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、脾炎または高血圧等の予防薬、治療薬を提供することを目的とする。

本発明者らは、hENT1の遺伝子配列情報を基に、ランダムなヒト c D N A 配列の遺伝子配列データベースGenbankに登録されている E S T (Expressed Sequence Tag) に関して、フレームサーチ [イスラエル、コンピュジェン (Compugen) 社製]

相同性検索ソフトウェアを用い解析し、hENT1と相同性の認められる部分配列(R07250およびAA608799)を見出した。これらのEST配列を用いて新規なトランスポーターポリペプチドのcDNAを取得して塩基配列を解析し、さらにラットのカウンターパートも取得して本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は以下の(1)～(45)の発明に関する。

(1) 配列番号1または5記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(2) 配列番号1または5記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつヌクレオシドのトランスポート活性を有するポリペプチド。

上記のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、出願前周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができ、また、1若しくは数個のアミノ酸とは、部位特異的変異誘発法により欠失、置換若しくは付加できる程度の数のアミノ酸を意味する。

かかる1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつヌクレオシドのトランスポート活性を有するポリペプチドは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー クローニング 第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント プロトコル イン モレキュラー バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、PCT W085/00817 (1985)、Nature, 316, 601 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

なお、該ポリペプチドは、公知のポリペプチドを含まない。

(3) 上記(1)または(2)のポリペプチドをコードするDNA。

(4) 配列番号2または6記載の塩基配列を有するDNA。

(5) 上記(3)または(4)のDNAとストリンジェントな条件下でハ

イブリダイズし、かつヌクレオシドのトランスポート活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

上記の「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつヌクレオシドのトランスポート活性を有するポリペプチドをコードするDNA」とは、上記(3)または(4)のDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー クローニング 第2版、カレント プロトコル イン モレキュラ バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。

ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号2または6で表される塩基配列と少なくとも80%以上の相同性を有するDNA、好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

また、該ポリペプチドをコードするDNAは、公知のものを含まない。

(6) 上記(3)～(5)のいずれか1項に記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

(7) 組換え体DNAが、プラスミドp46-1またはp3-2である、上記(6)の組換え体DNA。

(8) 上記(6)または(7)の組換え体DNAを保有する形質転換体。

(9) 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞から選ばれる形質転換体である、上記(8)の形質転換体。

(10) 微生物が、Escherichia属に属する微生物である、上記(9)の形質転換体。

(11) Escherichia属に属する微生物が、Escherichia coli JM109/p46-1 (FERM BP-6462) またはEscherichia coli JM109/p3-2 (FERM BP-6830) である、上記(10)の形質転換体。

(12) 上記(8)～(11)のいずれか1つに記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に上記(1)または(2)のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、上記(1)または(2)のポリペプチドの製造方法。

(13) 上記(3)～(5)のいずれか1つに記載のDNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチド。

(14) オリゴヌクレオチド誘導体が、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3' - P5' ホスホアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、DNA中のリボースが2' - O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体およびオリゴヌクレオチド中のリボースが2' - メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチド

誘導体である、上記（１３）のオリゴヌクレオチド。

（１５） 上記（１３）または（１４）のオリゴヌクレオチドを用い、上記（１）または（２）のポリペプチドをコードするmRNAを検出する方法。

（１６） 上記（１３）または（１４）のオリゴヌクレオチドを用い、上記（１）または（２）のポリペプチドの発現を抑制する方法。

（１７） 上記（１）または（２）のポリペプチドを認識する抗体。

（１８） 上記（１７）の抗体を用いることを特徴とする、上記（１）または（２）のポリペプチドの免疫学的検出法または免疫組織染色法。

（１９） 上記（１７）の抗体を含有する、免疫組織染色剤。

（２０） 上記（１）または（２）のポリペプチドと被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドの有するヌクレオシドのトランスポート活性を変動させる化合物のスクリーニング方法。

（２１） 上記（２０）の方法により得られる化合物。

（２２） 上記（１）または（２）のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

（２３） 上記（１）または（２）のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の変動の検出を、上記（１５）の方法を用いて、該ポリペプチドをコードするmRNAを検出することにより行うことを特徴とする、上記（２２）のスクリーニング方法。

（２４） 上記（１）または（２）のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の変動の検出を、上記（１８）の方法を用いて、該ポリペプチドを検出することにより行うことを特徴とする、上記（２２）のスクリーニング方法。

（２５） 上記（２２）～（２４）のいずれか１つに記載の方法により得られる化合物。

（２６） 上記（１）または（２）のポリペプチドを含有する、哺乳動物用の虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、

肺炎または高血圧の予防薬または治療薬。

(27) 上記(1)または(2)のポリペプチドを含有する、哺乳動物用の抗ウイルス剤または悪性腫瘍治療薬の作用増強剤。

(28) 上記(1)または(2)のポリペプチドを含有する、哺乳動物用の鎮痛薬または血小板凝集阻害薬。

(29) 上記(1)または(2)のポリペプチドを含有する、哺乳動物用の化学療法時の副作用の低減剤。

(30) 上記(13)または(14)のオリゴヌクレオチドを含有する、哺乳動物用の虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、肺炎または高血圧の予防薬または治療薬。

(31) 上記(13)または(14)のオリゴヌクレオチドを含有する、哺乳動物用の抗ウイルス剤または悪性腫瘍治療薬の作用増強剤。

(32) 上記(13)または(14)のオリゴヌクレオチドを含有する、哺乳動物用の鎮痛薬または血小板凝集阻害薬。

(33) 上記(13)または(14)のオリゴヌクレオチドを含有する、哺乳動物用の化学療法時の副作用の低減剤。

(34) 上記(17)の抗体を含有する、哺乳動物用の虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、肺炎または高血圧の予防薬または治療薬。

(35) 上記(17)の抗体を含有する、哺乳動物用の抗ウイルス剤または悪性腫瘍治療薬の作用増強剤。

(36) 上記(17)の抗体を含有する、哺乳動物用の鎮痛薬または血小板凝集阻害薬。

(37) 上記(17)の抗体を含有する、哺乳動物用の化学療法時の副作用の低減剤。

(38) 哺乳動物がヒトである、上記(26)、(30)および(34)いずれかに記載の虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、

悪性腫瘍、腎炎、肺炎または高血圧の予防薬または治療薬。

(39) 哺乳動物がヒトである、上記(27)、(31)または(35)いずれかに記載の抗ウイルス剤または悪性腫瘍治療薬の作用増強剤。

(40) 哺乳動物がヒトである、上記(28)、(32)または(36)いずれかに記載の鎮痛薬または血小板凝集阻害薬。

(41) 哺乳動物がヒトである、上記(29)、(33)または(37)いずれかに記載の化学療法時の副作用の低減剤。

(42) 上記(1)または(2)のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を司るプロモーターDNA。

(43) 上記(42)のプロモーターDNAおよび該プロモーターDNAの下流に連結させたレポーター遺伝子を含むプラスミドを保有する形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物含量を測定することを特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法。

(44) レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子から選ばれる遺伝子である、請求項43記載のスクリーニング方法。

(45) 上記(43)または(44)の方法により得られる化合物。

以下、本発明を詳細に説明する。

[1]本発明のDNAの取得およびオリゴヌクレオチドの調製

hENT1 [Nature Medicine, 3, 89 (1997)] と相同性をもつ遺伝子を、遺伝子データベース、蛋白質データベースより、Blast、Smith-Waterman法等を利用したプログラムあるいはフレームサーチ [イスラエル、コンピュジェン (Compugen) 社製] 相同性検索ソフトウェアを利用して検索する。

データベースとしてはGenBank、Swiss-Plot等の公的なデータベースを利用することができる。

得られた、hENT1と相同性をもつ遺伝子が、EST (Expressed Sequence Tag) のように遺伝子の一部の塩基配列のみである場合、あるいはラットなどヒト以外の哺乳類のhENT1相同遺伝子の場合は、以下のようにしてそのcDNAの全長を得ることができ、該cDNAより本発明のDNAを取得することができる。

(1) cDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリーを作製するために、適切な細胞または組織より全RNAあるいはmRNAを調製する。

全RNAを調製する方法として、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)]、酸性グアニジンチオシアネート・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987)、実験医学 9, 1937 (1991)] 等を用いることができる。

全RNAからポリ (A)⁺RNAとしてmRNAを調製する方法として、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (モレキュラー クローニング 第2版) やオリゴdTラテックスを用いる方法 [細胞工学 別冊8「新細胞工学実験プロトコール」秀潤社48-52頁(1993)、Nucleic Acids Res., Symposium Series, 19, 61(1988)] 等を用いることができる。

ファースト・トラック・mRNA単離キット [Fast Track mRNA Isolation Kit; インビトロジェン (Invitrogen) 社製]、クイック・プレップ・mRNA精製キット [Quick Prep mRNA Purification Kit; ファルマシア (Pharmacia) 社製] 等のキットを用いて組織や細胞から直接mRNAを調製することもできる。

適切な細胞または組織として、データベースから見出されたEST等が含まれていたcDNAライブラリーの種類を調べ、該ライブラリーを構築するために用いた細胞または組織、あるいは該組織由来の細胞株等を用いることが好ましい。

得られた全RNAあるいはmRNAを用い、常法によりcDNAライブラリーを作製する。

cDNAライブラリー作製法として、モレキュラー クローニング 第2版やカ

レント プロトコールズ イン モレキュラー バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング [SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; ギブコBRL (Gibco BRL) 社製] やザップー cDNA・シンセシス・キット [ZAP-cDNA Synthesis Kit、ストラタジーン社製] を用いる方法等をあげることができる。

cDNAライブラリーを作成するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。

具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (ストラタジーン社製)、 λ gt10、 λ gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、 λ TriplEx (クロンテック社製)、 λ ExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)]、pAMo [J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)]等をあげることができる。

宿主微生物としては、大腸菌Escherichia coliに属する微生物であればいずれも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF' [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、Escherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]、Escherichia coli SOLRTM Strain (ストラタジーン社製)、Escherichia coli LE392 (モレキ

ュラー クローニング 第2版) 等を用いることができる。

上記方法により作製したcDNAライブラリーに加え、市販のcDNAライブラリーも利用することができる。

市販のcDNAライブラリーとして、クローンテック社、ライフテックオリエンタル社等のヒト、ウシ、マウス、ラット、ウサギ等由来の各臓器cDNAライブラリーをあげることができる。

(2) 本発明のDNAの取得

上記(1)で作製したcDNAライブラリーより、本発明のDNAを有するcDNAクローンを、アイソトープあるいは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはプラーク・ハイブリダイゼーション法〔モレキュラー クローニング 第2版〕等により選択することができる。

プローブとしては、一部明らかになっている塩基配列に基いたプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応法 (Polymerase Chain Reaction; 以下、PCRと略す) を利用した方法〔PCR Protocols, Academic Press (1990)〕でcDNAの一部を増幅した断片や、一部明らかになっている塩基配列に基いたオリゴヌクレオチドを利用することができる。

プライマーとして、全長cDNAの5' 端側および3' 端側の両方の塩基配列がEST等により明らかになっている場合には、その塩基配列に基いて調製したプライマーを用いることができる。

該cDNAの両端にアダプターを付加し、このアダプターの塩基配列と一部明らかになっている塩基配列に基づいたプライマーでPCRを行う5' - RACE (rapid amplification of cDNA ends) および3' - RACE〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998 (1988)〕により、プライマーに用いた配列よりも5' 端側および3' 端側のcDNA断片を得ることができる。

得られたcDNA断片をつなぎあわせることにより、本発明の全長DNAを取得することができる。

上記の方法により取得されたDNAの塩基配列は、該DNA断片をそのままあ

るいは適当な制限酵素等で切断後常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー(Sanger)らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)]あるいはパーキン・エルマー社(Perkin Elmer: 373A・DNAシーケンサー)、ファルマシア社、ライコア(LI-COR)社等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより決定することができる。

上記方法により取得された本発明のDNAを含むプラスミドとして、例えば、配列番号2で表される塩基配列からなるDNAを有するプラスミドp46-1をあげることができる。

プラスミドp46-1を含有する大腸菌 Escherichia coli JM109/p46-1は、FERM BP-6462として、平成10年8月18日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託されている。

また、上記方法で取得したDNAの塩基配列情報を基に、あるいは該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを選択することにより、他の組織あるいは、他の動物由来、例えばヒト、ラット等由来の目的とするDNAを取得することができる。

このような方法により取得された本発明のDNAを含むプラスミドとして、例えば配列番号6で表される塩基配列からなるDNAを有するプラスミドp3-2等をあげることができる。

プラスミドp3-2を含有する大腸菌 Escherichia coli JM109/p3-2は、FERM BP-6830として、平成11年8月5日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託されている。

上記方法により得られた塩基配列情報に基づき、DNA合成機で化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。DNA合成機としては、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機model 392等をあげることができる。

得られた塩基配列の新規性に関しては、BLAST等の相同性検索プログラムを用

いて、GenBank、EMBLおよびDDBJ等の塩基配列データベースを検索することにより確認することができる。

新規な塩基配列については、アミノ酸配列に変換したのちFASTA、フレームサーチ (FrameSearch) 等の相同性検索プログラムを用いて、GenPept、PIR、Swiss-Prot等のアミノ酸配列データベースを検索することにより、相同性をもつ既存の遺伝子を検索することができる。

(3) 本発明のオリゴヌクレオチドの調製

上述の方法で取得した本発明のDNAおよびDNA断片を用いて、常法あるいは上記のDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することができる。

該オリゴヌクレオチドとしては、上記DNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができ、具体的には、配列番号2または6で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度 (T_m) および塩基数が極端に変わることはない上記のオリゴヌクレオチドが好ましい。

該オリゴヌクレオチドとして、例えば、配列番号3、4、7および8から選ばれるオリゴヌクレオチドをあげることができる。

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

該オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3' - P5' ホスホアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレ

オチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5 プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

〔2〕本発明のポリペプチドの調製

(1) 形質転換体の作製

上記〔1〕に記載の方法により取得した本発明のDNAを宿主細胞中で発現させ、本発明のポリペプチドを製造するために、モレキュラー クローニング 第2版、カレント プロトコル イン モレキュラ バイオロジー等に記載された方法を用いることができる。

即ち、本発明のDNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換えベクターを造成し、該ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドを発現する形質転換体を取得し、該形質転換体を培養することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なものは染色体中への組込が可能で、本発明のDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合、本発明のポリペプチド遺伝子

発現ベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列、より構成された組換えベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（ファルマシア社）、pSE280（インビトロジェン社）、pGEMEX-1〔プロメガ(Promega)社〕、pQE-8（キアゲン(QIAGEN)社）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200〔Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)〕、pLSA1〔Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)〕、pGEL1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)〕、pBluescript II SK(-)（ストラタジーン社）、pTrs32（FERM BP-5408）、pGHA2（FERM BP-400）、pGKA2（FERM B-6798）、pTerm2（特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735）、pGEX（ファルマシア社）、pET-3（ノバジェン社）、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus（Invitrogen社）、pMAL-c2（New England Biolabs社）等をあげることができる。

プロモーターとしては、大腸菌や枯草菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター（Ptrp）、lacプロモーター（Plac）、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター、T7プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またPtrpを2つ直列させたプロモーター（Ptrp x 2）、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列としては、シャインーダルガノ（Shine-Dalgarno）配列と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6～18塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法（特開昭63-248394）、エレクトロポレーション法[Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)]等をあげることができる。

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を用いることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものをを用いてもよく、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属等に属する酵母菌株をあげる

ことができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Pichia pastoris等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods in Enzymology, 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法 [Journal of Bacteriology, 153, 163 (1983)]等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p c DNA I / Amp (インビトロジェン社製)、p c DNA I、p CDM 8 [Nature, 329, 840 (1987)]、p A G E 1 0 7 [特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、p R E P 4 (インビトロジェン社製)、p A G E 1 0 3 [Journal of Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、p A M o、p A M o A、p A S 3 - 3 (特開平2-227075)等が用いられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーターあるいはメタロチオネインのプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、S R α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

動物細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞または Namalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299)等をあげることができる。

マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NS0等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293(ATCC: CRL-1573)、293等、ヒ

ト白血病細胞としては、BALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法

[Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, NewYork (1992)]、モレキュラー・バイオロジリー ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Biology, A Laboratory Manual)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジリー、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジェン社製)等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusia niの卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。

Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞としてはSf9、Sf21 (バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル) 等、Trichoplusia niの卵巣細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4 (インビトロジェン社製) 等、カイ

コ卵巣由来の培養細胞としてはBombyx mori N4等をあげることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー クローニング 第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

また、患者の生体内から採取した細胞に、適切な本発明のポリペプチドを発現させるための発現ベクターを導入した後、細胞を生体内に戻すことにより、本発明のポリペプチドを患者の生体内で発現させることもできる。

（2）形質転換体の培養

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7

日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地〔ファーミンジェン (Pharmingen) 社製〕、Sf-900 II SFM培地 (ライフ・テクノロジーズ社製)、ExCell400、ExCell405〔いずれもJRHバイオサイエンス (JRH Biosciences) 社製〕、Grace's Insect Medium〔Nature, 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。

培養は、通常pH 6～7、25～30℃等の条件下で1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

(3) 発現させたポリペプチドの単離精製

上記形質転換体の培養液から、上記方法により発現させたポリペプチドを単離精製するためには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明のポリペプチドが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。

該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学社製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (ファルマシア社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を、蛋白質変性剤を含まないか、あるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

本発明のポリペプチドあるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチドあるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。

即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

また、本発明のポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる。例えば、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Dev., 4, 1288 (1990)]、特開平05-336963、特開平06-823021に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。また、本発明のポリペプチドをF l a g ペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗F l a g 抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Dev., 4, 1288 (1990)]。更に、該ポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

更に、本発明のポリペプチドは、F m o c 法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、t B o c 法（t -ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によ

っても製造することができる。

また、アドバンスド・ケムテック (Advanced ChemTech) 社、パーキン・エルマー社、ファルマシア社、プロテイン・テクノロジー・インストゥルメント (Protein Technology Instrument) 社、シンセセル・ベガ (Synthecell-Vega) 社、パーセプティブ (PerSeptive) 社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、蛋白質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析 (平野久著、東京化学同人発行、1993年) に記載の方法により実施可能である。

〔3〕 本発明のポリペプチドを認識する抗体の調製

(1) ポリクローナル抗体の調製

上記〔2〕の方法により取得した本発明のポリペプチドの全長または部分断片精製標品を抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、3～20週令のラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。

該抗原の投与量は動物1匹当たり50～100 μ gが好ましい。

ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン (keyhole limpet haemocyanin) や牛チログロブリン等のキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。

該抗原の投与は、1回目の投与の後1～2週間おきに3～10回行う。各投与後、3～7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法 (ELISA法) : 医学書院刊 1976年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)〕等で確認する。

免疫に用いた抗原に対し、該血清が十分な抗体価を示した非ヒトほ乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿〔Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)〕、またはDEAEセファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはGーカラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

(2) モノクローナル抗体の調製

(2-1) 抗体産生細胞の調製

上記(1)において、免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。

該脾臓をMEM培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の脾細胞をトリスー塩化アンモニウム緩衝液（pH7.65）で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

(2-2) 骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。例えば、8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1(P3-U1)〔Curr. Topics Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Eur. J. Immunol., 6, 511 (1976)〕、SP2/0-Ag14(SP-2)〔Nature, 276, 269 (1978)〕、P3-X63-Ag8653(653)〔J. Immunol., 123, 1548 (1979)〕、P3-X63-Ag8(X63)〔Nature, 256, 495 (1975)〕等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培

地〔RPMI-1640培地にグルタミン (1.5mM)、2-メルカプトエタノール ($5 \times 10^{-5}M$)、ジェンタマイシン ($10 \mu g/ml$) および牛胎児血清 (FCS) (CSL社製、10%)を加えた培地 (以下、正常培地という) に、さらに8-アザグアニン ($15 \mu g/ml$)を加えた培地〕で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を 2×10^7 個以上用いる。

(2-3)ハイブリドーマの作製

(2-1)で取得した抗体産生細胞と(2-2)で取得した骨髓腫細胞をMEM培地またはPBS (リン酸二ナトリウム 1.83g、リン酸一カリウム 0.21g、食塩 7.65g、蒸留水 1リットル、pH 7.2)でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞：骨髓腫細胞 = 5~10:1になるよう混合し、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、 10^8 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000) 2g、MEM 2mlおよびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7mlを混合した溶液を0.2~1ml添加し、更に1~2分間毎にMEM培地 1~2mlを数回添加する。

添加後、MEM培地を加えて全量が50mlになるように調製する。

該調製液を900rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地〔正常培地にヒポキサンチン ($10^{-4}M$)、チミジン ($1.5 \times 10^{-5}M$) およびアミノプテリン ($4 \times 10^{-7}M$)を加えた培地〕100ml中に懸濁する。

該懸濁液を96穴培養用プレートに $100 \mu l$ /穴ずつ分注し、5% CO_2 インキュベーター中、37℃で7~14日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとりアンチボディイズ [Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapter14 (1988)]等に述べられている酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドに特異的に反応するハ

イブリドーマを選択する。

酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法をあげることができる。

免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの全長または部分断片精製標品を適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(2-4)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明のポリペプチドに特異的に反応するものを本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し〔1回目は、HT培地（HAT培地からアミノプテリンを除いた培地）、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株として選択する。

(2-4)モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristane) 0.5 ml を腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8～10週令のマウスまたはヌードマウスに、(2-3)で取得した本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞 $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10～21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000 rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。

得られた上清より、ポリクローナル抗体で用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。蛋白質量は、ローリー法あるいは280 nmでの吸光度より算出する。

〔４〕本発明のポリペプチドのヌクレオシドトランスポーター活性の測定

〔２〕に記載の方法により、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等を宿主として、本発明のポリペプチドを発現させたもの、あるいは、アフリカツメガエル卵母細胞にDNAあるいはin vitroで調製したcRNAを用いてマイクロインジェクション法により発現させたものを以下のヌクレオシドトランスポーター活性の測定に利用する〔Methods in Enzymology, 207, 225 (1992)、Methods in Enzymology, 254, 458 (1995)〕。

また、公知の方法によりリポソーム膜〔脂質二重層(lipid bilayer)〕上に上記で発現させた本発明のポリペプチドを再構成したものも以下の測定に用いることができる〔J. Biol. Chem., 272, 617 (1997)、Biochim. Biophys. Acta., 1024, 289 (1990)、J. Biol. Chem., 252, 7384 (1977)〕。

ヌクレオシドトランスポーター活性は、本発明のポリペプチド存在下で、蛍光標識あるいはアイソトープ標識したヌクレオシド、例えば [5,6-³H] uridine、[¹⁴C] uridine、[¹⁴C] adenosine等の、細胞あるいはリポソーム内への取り込みを測定することにより求めることができる〔Biochim. Biophys. Acta., 649, 769 (1981)、Nature Medicine, 3, 89 (1997)、Biochem. J., 315, 329 (1996)、Biochim. Biophys. Acta., 1024, 289 (1990)〕。

〔５〕本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの探索・同定および治療薬としての利用

上記〔４〕の活性測定に用いることのできる細胞、リポソームあるいは、後述〔７〕の方法で本発明のポリペプチドを発現していることの確認された組織、細胞等を用い、被験試料を添加し、〔４〕記載の方法で、トランスポーター活性を測定する。

被験試料の添加の有無における、本発明のポリペプチドのトランスポーター活性〔Biochim. Biophys. Acta., 649, 769 (1981)、Nature Medicine, 3, 89 (1997)、

Biochem. J., 315, 329 (1996)、Biochim. Biophys. Acta., 1024, 289 (1990)] を比較することにより、被験試料の中からトランスポーター活性を増強する物質（アゴニスト）および阻害する物質（アンタゴニスト）をスクリーニングすることができる。

また、以下の方法を用いても、本発明のポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストをスクリーニングすることができる。

上記の本発明のポリペプチドを発現している細胞、組織、これらから調製した細胞膜、精製した本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドの部分断片を用い、これらへの標識化合物の結合の有無を確認する [Biochem. J., 327, 31 (1997)、Life Sciences, 59, 2051 (1996)、Biochem. J., 300, 407 (1994)]。

標識化合物としては、例えば、 $[^3\text{H}]$ NBMPR 等のアイソトープ標識ヌクレオシドアナログ、アイソトープ標識した非ヌクレオシド骨格を有するヌクレオシドトランスポーター阻害剤 [Current Medicinal Chemistry, 4, 35 (1997)] をあげることができる。

結合が認められた標識化合物を用い、上記と同様の条件下で被験試料を添加し、上記と同様に標識化合物の結合量を測定する。

被験試料の添加の有無における、標識化合物の結合量を比較することにより、被験試料の中からアゴニストおよびアンタゴニストをスクリーニングすることができる。

被験試料としては、合成化合物、天然に存在する蛋白質、人工的に合成された蛋白質、ペプチド、糖質、脂質、これらの修飾体、誘導体を、また哺乳動物（例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、ヒト等）の尿、体液、組織抽出物、細胞培養上清、細胞抽出物を、更に、非ペプチド性化合物、発酵生産物、植物その他の生物の抽出物等をあげることができる。

上記の方法により取得される、本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストは、治療薬として単独で用いることが可能ではあるが、通常は薬理学

的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として用いることが望ましい。

該治療薬の投与方法としては、治療に際し最も効果的な方法を使用することが望ましく、経口投与または、口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与による方法を用いることができる。

該治療薬の剤形としては、軟膏剤、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、テープ剤等をあげることができる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等をあげることができる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造することができる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用い製造することができる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、例えば、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製することができる。

座剤は、例えば、カカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製することができる。

噴霧剤は、上記で取得されたアゴニストまたはアンタゴニストをそのまま噴霧剤として用いることが可能であるが、受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、

かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製した噴霧剤が好ましい。

担体として、具体的には乳糖、グリセリン等を例示することができる。

上記で取得されたアゴニストまたはアンタゴニスト、および担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤を調製することが可能である。

これらの非経口剤においても、経口剤で添加剤として例示した成分を添加することができる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg} \sim 8\text{mg}/\text{kg}$ である。

[6]本発明のポリペプチドの発現を調節する化合物（以下、発現調節化合物と略す）の探索および同定

(1)本発明の抗体を用いた発現調節化合物の探索および同定

本発明のポリペプチドを発現する細胞を被験試料と接触させた後、本発明の抗体を用いることにより、その細胞中、細胞培養上清中に存在する発現調節化合物を探索、同定することができる。

細胞としては、本発明のポリペプチドを発現している細胞、細胞株、組織ならいかなるものでも用いることができる。

また、下記[7]に記載した抗体により免疫学的に検出する方法を用い、該ポリペプチドの発現が認められた細胞、細胞株あるいは組織を用いることができる。

好適な細胞株として、例えば、ヒト腎臓由来HEK293細胞(ATCC: CRL-1573)をあげることができる。

被験試料としては、上記[5]の被験試料であげたものを用いることができる。

本発明のポリペプチドを発現する細胞を、該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞と接触させた後、本発明の抗体を用い、該細胞の発現したポリペプチド含量を定量する。定量する方法としては、

例えば下記の免疫細胞染色を利用した方法をあげることができる。

培養付着細胞をPBS緩衝液で洗浄し、0.05% トリプシン、0.02% EDTA(エチレンジアミン4酢酸)を含むPBS緩衝液3mlを加え、余分な溶液を除いた後、37℃、5分間インキュベートすることによりフラスコより細胞を剥がす。

浮遊細胞については培養細胞をそのまま用いることができる。

免疫細胞染色を行う細胞を免疫細胞染色用緩衝液(1% BSA、0.02% EDTA、0.05% アジ化ナトリウムを含むPBS)等に懸濁し、 $1 \sim 20 \times 10^5$ 個ずつ丸底96穴プレートに分注する。

該プレートに、本発明のモノクローナル抗体を分注する。

モノクローナル抗体としては、[3](2-3)で取得した本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清、[3](2-4)で取得した精製モノクローナル抗体をあげることができる。更に、該モノクローナル抗体を標識した抗体も用いることができる。

モノクローナル抗体を標識した抗体としては、例えばビオチン標識した抗体をあげることができる。

ビオチン標識した抗体は公知の方法(酵素抗体法：学際企画刊1985年)で調製することができる。

上記抗体を、免疫細胞染色用緩衝液あるいは10%動物血清を含む免疫細胞染色用緩衝液を用いて $0.1 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ の濃度になるように希釈する。

該希釈抗体を $20 \sim 500 \mu\text{l/穴}$ となるように分注し、氷冷下で30分間放置する。

標識されていない抗体を用いた場合には、上記プレートに免疫細胞染色用緩衝液を添加し、細胞を洗浄後、FITC (fluorescein isothiocyanate) あるいはフィコエリスリン等の蛍光色素で標識した抗マウスイムノグロブリン抗体あるいは抗ラットイムノグロブリン抗体を $0.1 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ 程度の濃度で含む免疫細胞染色用緩衝液を $50 \sim 500 \mu\text{l/穴}$ ほど分注し、氷冷下で30分間遮

光して放置する。

ビオチン標識した該モノクローナル抗体を用いた場合には、上記プレートにFITCあるいはフィコエリスリン等の蛍光色素で標識したストレプトアビジンを50～500 μ l/穴ほど分注し、氷冷下で30分間遮光して放置する。

両ケースとも、放置後、プレートに免疫細胞染色用緩衝液を添加し、細胞を良く洗浄し、蛍光顕微鏡、セルソーター等により解析する。

被験試料を添加しない系と比較し、本発明のポリペプチド含量を増加あるいは減少させることのできた被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

(2) 本発明のポリペプチド遺伝子の転写産物定量系を用いた探索および同定
本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドをコードするmRNAを発現する細胞を被験試料と接触させた後、該mRNA含量を定量することにより発現調節化合物を探索、同定することができる。

本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドmRNAを発現する細胞および被験試料として、上記[5]および[6](1)のものを用いることができる。

本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドをコードするmRNAを発現する細胞を、該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞を接触させた後、該細胞が発現した該mRNAの含量を、通常のノーザンハイブリダイゼーション法、RNAのドットブロットハイブリダイゼーション法、RT-PCR法等を用い定量する。

ハイブリダイゼーション法等に用いることのできるプローブおよびRT-PCR法等に用いることのできるプライマーとして、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子断片をあげることができる。

具体的には、配列番号2または6記載の塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを好適に用いることができる。

被験試料を添加しない系と比較し、本発明のポリペプチドをコードするmRNA

A含量を増加あるいは減少させることのできた被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

(3) レポーター遺伝子を用いた探索および同定

本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を制御する領域（以下、転写制御領域と略す）の下流にレポーター遺伝子の連結されたDNAを含むプラスミドで形質転換された形質転換体と被験試料とを接触させた後、レポーター遺伝子によりコードされたポリペプチドの発現量を定量することにより発現調節化合物を探索、同定することができる。

転写制御領域は、通常、遺伝子の5'上流に含まれることが多い。本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の5'上流領域は、例えばGenome Walker kits (Clontech社製)等を用いて調製することができる。また、該領域を適当な制限酵素を用い、適切な長さに切断した断片を転写制御領域として用いることができる。

レポーター遺伝子としては、該遺伝子の翻訳産物が細胞内で安定であり、該翻訳産物の存在量が容易に定量できるものであればいかなるものでも用いることができ、例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、 β -ガラクトシダーゼ(β -gal)、ルシフェラーゼ(luc)、グリーンフルオレッセントプロテイン(GFP)等をあげることができる。

該転写制御領域を含むレポータープラスミドを導入する宿主細胞としては、いかなる細胞も用いることができるが、好適には、[6](1)記載の本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドmRNAの発現が認められている細胞株を用いることができる。

被験試料として、上記[5]のものを用いることができる。

転写制御領域の下流に常法によりレポーター遺伝子を連結し、作製したプラスミドを用い、常法により宿主細胞を形質転換する。

また、ポジティブセクション用マーカー(G418耐性遺伝子等)およびネガティブセクション用マーカー(単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼや

ジフテリア毒素Aフラグメント遺伝子等)をつないだジーンターゲットイングベクターを作成し、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の一部をレポーター遺伝子で置換した細胞株を作成することもできる [Nature, 336, 348 (1988)、Analytical Biochemistry, 214, 77 (1993)、Gene Targeting, The Practical Approach Series, IRL Press (1993)]。

該形質転換体を、例えば該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞を接触させた後、該細胞の発現したレポーター遺伝子にコードされたポリペプチドの量を、該ポリペプチドに適した方法で検出、定量する。

検出、定量法として、レポーター遺伝子がCATの場合には、例えば、モレキュラー クローニング 第2版, 16章, 60頁に記載の方法を、 β -galの場合には、例えば、モレキュラー クローニング 第2版, 16章, 66頁に記載の方法を、lucの場合には、例えば、実験医学別冊バイオマニュアルシリーズ4 遺伝子導入と発現・解析法, 81 (1994)に記載の方法を、GFPの場合には、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 4653 (1997)記載の方法等をあげることができる。

被験試料を添加しない系と比較し、レポーター遺伝子にコードされたポリペプチド含量を増加あるいは減少させることのできた被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

[7] 本発明のDNA、ポリペプチド、抗体、アゴニスト、アンタゴニストおよび発現調節化合物の利用

(1) 本発明のDNAは、該DNAをプローブとして用いて、哺乳動物の組織や哺乳動物由来の細胞から [1] (1)と同様にして抽出したRNAについてノーザンハイブリダイゼーションを行うことにより、その組織や細胞における本発明のポリペプチド遺伝子のmRNAを検出あるいは定量することができる。各種の組織でそのmRNAの発現量を比較することにより本発明のポリペプチドの組

組織発現分布を知ることができる。

本発明における哺乳動物とは、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル等の動物をいう。

(2) 本発明のオリゴヌクレオチドは、本発明のDNAの特異的プライマーとして用いて、哺乳動物の組織や哺乳動物由来の細胞から1と同様にして抽出したRNAについてRT-PCR[reverse transcription PCR; PCR Protocols (1990)]を行うことにより、本発明のポリペプチドをコードするmRNAの検出や定量を行うことができる。

該mRNAを定量する方法は、本遺伝子が関与する病態の診断や細胞障害性ヌクレオシド誘導体(抗腫瘍剤、抗ウイルス剤)の効果の予測等に用いることができる。

各種病態モデル動物において、該mRNAを定量することにより、病態における該遺伝子産物の重要性を明らかにすることができる。また、薬剤の有無による該mRNAの発現量を比較することにより薬剤を評価することができる。

(3) 本発明のオリゴヌクレオチドは、これをプローブとして用いて、哺乳動物の組織切片に対してin situハイブリダイゼーション[Methods in Enzymology, 254, 419 (1995)]を行うことにより、組織内での本発明のポリペプチドの発現細胞の特定等のより細かい発現分布を知ることができる。

これらの方法によって得られる、本発明のポリペプチドがどのような組織や細胞で発現しているかに関する情報および細胞がどのような刺激を受けたときに発現量が変化するかに関する情報は、本発明のポリペプチドの生理機能や病態への関与を解析するために有用である。

(4) 本発明のDNAをプローブとして用い、ゲノムDNAに対してサザンハイブリダイゼーション[モレキュラー クローニング 第2版]を行うことにより、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の変異を検出することができる。

変異の検出を行うことにより、該遺伝子の変異が原因となっている可能性のある、高血圧、虚血性心疾患、腎炎や膵炎等の疾患の診断を行うことができる。

(5) 本発明のアンチセンス・オリゴヌクレオチド(RNA/DNA)を用い、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写もしくはmRNAの翻訳を抑制することにより〔化学, 46, 681 (1991)、Bio/Technology, 9, 358 (1992)〕、該遺伝子が発症に関与している可能性のある、例えば高血圧、虚血性心疾患、腎炎や脾炎等の疾患の予防や治療に用いることができる。

また、臓器移植に伴う免疫反応、鎮痛、血小板凝集阻害、化学療法時の副作用の低減、抗ウイルス剤および悪性腫瘍治療薬の作用増強剤、脳卒中時の脳障害の治療あるいは予防等への応用も期待される。

上述のアンチセンス・オリゴヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列中の連続した5～60塩基と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、好ましくは本発明のポリペプチドをコードするDNAの翻訳開始領域にある5～60塩基と相補的な塩基配列を基にして設計・調製し、生体内に投与する。

本発明のDNAを含有する医薬は、上記〔5〕の本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの医薬製剤の調製法と同様な方法を用いて調製することができ、調製された該医薬製剤を上記〔5〕の場合と同様の方法で投与することができる。

(6) 本発明のDNAを用い、〔2〕記載の方法により本発明のポリペプチドを取得することができる。

本発明のポリペプチドの用途としては、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、脾炎または高血圧の治療薬または予防薬が考えられる。また、鎮痛薬、血小板凝集阻害薬、抗ウイルス剤および悪性腫瘍治療薬の作用増強剤あるいは、化学療法時の副作用の低減剤としての応用が期待される。

本発明のポリペプチドを含有する医薬は、上記〔5〕の本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの医薬製剤の調製法と同様な方法を用いて調製することができ、調製された該医薬製剤を上記〔5〕の場合と同様の方法で

投与することができる。

(7) 本発明のオリゴヌクレオチドは一本鎖または二本鎖としてレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルスベクター、その他のベクターに組み込んで遺伝子治療用ベクターとし、遺伝子治療に用いることができる。

(8) 本発明のポリペプチドを抗原として用い、[3]記載の方法により本発明のポリペプチドに対する抗体を製造することができる。

本発明のポリペプチドに対する抗体を用いて、本発明のポリペプチドを免疫学的に検出または定量することができる。

具体的にはマイクロタイタープレートを用いるELISA法、酵素標識抗体法や蛍光抗体法による免疫組織染色、ウェスタンブロット法等を用いた検出法をあげることができる。

具体的には、液相中で本発明のポリペプチドと反応する抗体のうちエピトープが異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法、¹²⁵I等の放射性同位体で標識した本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドを認識する抗体を用いるラジオイムノアッセイ法等があげることができる。

また、本発明の抗体は病理組織切片を用いた免疫組織染色にも利用できる。

本発明の抗体を用い、健常者および被験者の細胞または組織に存在する本発明のポリペプチドを免疫学的に検出または定量し、その量を健常者と被験者とで比較し、発現量が増加しているかどうかを調べることにより、被験者の虚血性心疾患、高血圧等の病態の診断や細胞障害性ヌクレオシド誘導体（抗腫瘍剤、抗ウイルス剤）の効果の予測等に用いることができる。

また、本発明の抗体を用いて、各種病態モデル動物の組織および細胞に存在する該ポリペプチドを免疫学的に検出または定量し、正常動物と比較することにより、病態における該ポリペプチドの重要性を明らかにすることができる。さらに、薬剤の有無による該ポリペプチドの発現量を比較することにより薬剤を評価することができる。

(9) 本発明のポリペプチドの機能（トランスポーター活性）を阻害する抗体

を投与することにより、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、脾炎または高血圧の治療または予防、抗ウイルス剤および悪性腫瘍治療薬の作用増強、鎮痛作用、血小板凝集阻害さらには化学療法時の副作用の低減等が期待される。

本発明の抗体を含有する医薬は、上記〔5〕の本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの医薬製剤の調製法と同様な方法を用いて調製することができ、調製された該医薬製剤を上記〔5〕の場合と同様の方法で投与することができる。

（10）本発明のアゴニスト、アンタゴニストおよび本発明のポリペプチド遺伝子の発現を調節する化合物は、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、脾炎または高血圧の治療または予防、抗ウイルス剤および悪性腫瘍治療薬の作用増強、鎮痛作用、血小板凝集阻害さらには化学療法時の副作用の低減等が期待される。

図面の簡単な説明

第1図 プラスミド p 4 6 - 1 の構築過程および制限酵素地図を示した図である。

第2図 p 4 6 - 1 にコードされる新規ヒトトランスポーター(hENTR1)のアミノ酸配列とヒト e s 型トランスポーター h E N T 1 およびヒト e i 型トランスポーター h E N T 2 のアミノ酸配列を比較した図である。アスタリスクで示した箇所は一致しているアミノ酸残基を示す。（アミノ酸残基は一文字表記で示す。）

第3図 hENT1のアミノ酸配列において膜貫通領域と推定される領域（下線部分）とhENT2およびhENTR1のアミノ酸配列を比較した図である。アスタリスクで示した箇所は一致しているアミノ酸残基を示す。（アミノ酸残基は一文字表記で示す。）

第4図 p 4 6 - 1 にコードされる新規ヒトトランスポーター(hENTR1)、ヒト e s 型トランスポーターhENT1およびヒト e i 型トランスポーターhENT2のアミノ酸配列を基に疎水性プロットを比較した図である。

第5図 新規ヒトトランスポーター(hENTR1) cDNAの一部の配列(約1 kb)をプローブとしてヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓のpoly(A)⁺ RNAフィルター [Human Multiple Tissue Northern Blotsのフィルター(Clontech社製)] に対してノーザンハイブリダイゼーションを行った結果を示した図である。

第6図 プラスミド p 3-2 の構築過程および制限酵素地図を示した図である。

第7図 新規ヒトトランスポーター(hENTR1)アミノ酸配列と新規ラットトランスポーター(rENTR1)アミノ酸配列の相同性を比較した図である。アステリクスは一致しているアミノ酸残基、ピリオドは相同性のあるアミノ酸残基を示す。(アミノ酸残基は一文字表記で示す。)

第8図 プラスミド p RENTR1-Norの構築過程および制限酵素地図を示した図である。

第9図 新規ラットトランスポーター(rENTR1) cDNAの一部の配列(約0.4 kb)をプローブとしてラット心臓、脳、脾臓、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、精巣のpoly(A)⁺ RNAフィルター [rat Multiple Tissue Northern Blotsのフィルター(Clontech社製)] に対してノーザンハイブリダイゼーションを行なった結果を示した図である。

第10図 新規ラットトランスポーター(rENTR1) cDNAの一部の配列(約0.4 kb)をプローブとしてマウス心臓、脳、脾臓、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、精巣のpoly(A)⁺ RNAフィルター [mouse Multiple Tissue Northern Blotsのフィルター(Clontech社製)] に対してノーザンハイブリダイゼーションを行なった結果を示した図である。

【符号の説明】

kb: キロ塩基対 (kilobase pairs)

Ap: アンピシリン耐性遺伝子

knt: キロヌクレオチド (kilonucleotides)

発明を実施するための最良の形態

以下により具体的な実施例をあげて説明するが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

実施例1 hENT1関連蛋白(hENTR1) cDNAのクローン化

(1) ヒト胎児腎由来cDNAライブラリーからのクローン化

遺伝子操作的手法として、特に断らない限り公知のモレキュラー クローニング 第2版に記載されている手法を用いた。

hENT1 [Nature Medicine, 3, 89 (1997)] と相同性をもつEST配列 (Genbank, ACCESSION R07250) より配列番号3に示される5' 端側DNAプライマーを設計し、合成した。同様にEST配列 (Genbank, ACCESSION AA608799) より配列番号4に示される3' 端側DNAプライマーを設計し、合成した。

配列番号3または配列番号4のプライマー200pmolを50mM トリスー塩酸 (pH 8.0)、10mM 塩化マグネシウム、5mM ジチオスレイトール、5mM アデノシン3リン酸を含む緩衝液20 μ lに溶解し、10単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製) を加えて、37℃で2時間リン酸化反応を行い、2種類のリン酸化プライマーを取得した。

得られた2種類のリン酸化プライマー各々0.2 μ M、ヒト胎児腎由来cDNAライブラリー (Clontech社製、商品名: Human Fetal Kidney 5'-STRETCH PLUS cDNA Library) 2 μ l、各成分200 μ MのdNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP) 混合液、TaKaRa Ex Taq (宝酒造社製) 2.5単位および1 \times Ex Taq緩衝液 (Mg plus) を含む反応溶液50 μ lを用い、下記条件下でPCRを行った。

即ち、TaKaRa PCR Thermal Cycler 480を用い、95℃で2分間加熱後、94℃で1分間、60℃で1分間、72℃で1分間の工程を1サイクルとして35サイクル行い、更に72℃で8分間加熱した。

得られた該PCR反応液より5 μ lを分取し、アガロース電気泳動にかけ、予

想される約1 kbのDNA断片が増幅されたことを確認した。

確認後、上記PCR反応液より、増幅されたDNA断片を、Wizard DNA Clean-Up System(Promega社製)を用い、滅菌水で溶出することにより、精製該DNA断片を取得した。

該DNA断片を、33 mM トリス-酢酸 (pH 7.9)、66 mM 酢酸カリウム、10 mM 酢酸マグネシウム、0.5 mM ジチオスレイトール、各成分100 μ MのdNTP混合液、0.01%ウシ血清アルブミンを含む緩衝液100 μ lに溶解し、5単位のT4 DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)を加えて、37℃で15分間保温し平滑化反応を行った。

該反応液より、Wizard DNA Clean-Up System(Promega社製)を用いて、平滑化されたDNA断片を回収した。

該DNA断片をベクターに挿入するために、下記条件でベクターの調製を行った。

pBluescriptII SK(-)(STRATAGENE社製)の5 μ gを10 mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM ジチオスレイトールからなる緩衝液30 μ l中で15単位のEcoRV(宝酒造社製)により37℃で2時間消化反応を行った。

該反応液よりエタノール沈殿により、pBluescriptII SK(-)消化DNA断片を回収した。

該DNA断片を50 mM トリス-塩酸 (pH 9.0)、1 mM 塩化マグネシウムからなる緩衝液30 μ l中で0.5単位のアルカリホスファターゼ(宝酒造社製;E.coli C75由来)を用い、60℃で30分間脱リン酸化反応を行った。

得られた反応液をアガロース電気泳動にかけ、約3 kbのDNA断片を回収した。

該DNA断片を、QIAEX II gel extraction kit(QIAGEN社製)を用い、添付のマニュアルに従って精製した。

上記で回収した平滑化されたDNA断片50 ngおよびpBluescriptII SK(-)

の E c o R V、アルカリホスファターゼ処理済み断片 50 ng を 66 mM トリスー塩酸 (pH 7.5)、6.6 mM 塩化マグネシウム、10 mM ジチオスレイトール、0.1 mM アデノシン 3 リン酸を含む緩衝液 20 μ l に溶解し、T4 DNA リガーゼ (宝酒造社製) 175 単位を加えて 16 $^{\circ}$ C で 16 時間結合反応を行った。

該反応により得られた組み換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、常法によりプラスミド pHENT1homologue を得た。

制限酵素解析の結果、プラスミド pHENT1homologue に含まれる DNA 断片には X b a I 部位が 1 ヶ所存在し、挿入 DNA 断片中の X b a I 部位とベクター pBluescriptII SK(-) のマルチクローニングサイト由来の X b a I 部位からは約 390 bp の断片が切り出されることが判明した。

pHENT1homologue を 30 μ g、10 mM トリスー塩酸 (pH 7.5)、10 mM 塩化マグネシウム、50 mM 塩化ナトリウム、0.01% 牛血清アルブミン、1 mM ジチオスレイトールを含む緩衝液 50 μ l に溶解し、40 単位の X b a I (宝酒造社製) を加え、37 $^{\circ}$ C で 4 時間消化反応を行った。

該反応液をアガロース電気泳動にかけ、約 390 bp の DNA 断片を回収した。

該 DNA 断片を、QIAEX II gel extraction kit (QIAGEN 社製) を用い、添付のマニュアルに従って精製した。

精製された該 DNA 断片を、ECL ダイレクト核酸ラベリング・検出システム (Amersham 社製) を用いて、ホースラディッシュスーパーオキシダーゼ標識し、プローブとして用いた。

該プローブを用いてヒト胎児腎由来 cDNA ライブラリー (Clontech 社製、商品名: Human Fetal Kidney 5'-STRETCH PLUS cDNA Library) 5×10^5 クローンを用いて、ブランクハイブリダイゼーションを行い、プローブにハイブリダイズする 6 個の独立したファージクローン (ベクター: λ g t 10) を得た (クローン 24-1、40-1、41A-1、41B-1、46-1 および 57-1)。該ハイブリダイゼーションの操作は、全て ECL ダイレクト核酸ラベリング・検

出システム(Amersham社製)のマニュアルに従って行った。

該ファージクローンのうちクローン46-1に含まれるcDNA断片を、ファージベクターからプラスミドベクターへ組み換え直した。

該ファージクローン46-1のDNA20 μ gを、10mM トリス-塩酸(pH7.5)、10mM 塩化マグネシウム、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトールを含む緩衝液30 μ l中に溶解し、15単位のEcoRI(宝酒造社製)を添加し、37℃で4時間消化反応を行った。

該反応液をアガロース電気泳動かけ、約2.3kbのDNA断片を回収した。

該DNA断片を、QIAEX II gel extraction kit(QIAGEN社製)を用い、添付のマニュアルに従って精製した。

pBluescriptII KS(-)(STRATAGENE社製)5 μ gを10mM トリス-塩酸(pH7.5)、10mM 塩化マグネシウム、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトールを含む緩衝液30 μ lに溶解し、15単位のEcoRI(宝酒造社製)を添加し、37℃で2時間消化反応を行った。

該反応液よりエタノール沈殿によりEcoRI消化DNA断片を回収した。

該DNA断片を50mM トリス-塩酸(pH9.0)、1mM 塩化マグネシウムを含む緩衝液30 μ lに溶解し、0.5単位のアルカリホスファターゼ(宝酒造社製;E.coli C75由来)を添加し、60℃で30分間脱リン酸化反応を行った。

該反応液をアガロース電気泳動にかけ、約3kbのDNA断片を回収した。

該DNA断片を、QIAEX II gel extraction kit(QIAGEN社製)を用い、添付のマニュアルに従って精製した。

上述のクローン46-1より得られた約2.3kbのEcoRIDNA断片150ngおよびpBluescriptII KS(-)のEcoRI-アルカリホスファターゼ処理済み断片50ngを66mM トリス-塩酸(pH7.5)、6.6mM 塩化マグネシウム、10mM ジチオスレイトール、0.1mM アデノシン3リン酸を含む緩衝液20 μ lに溶解し、T4 DNAリガーゼ(宝酒造社製)175単位を添加し、16℃で16時間結合反応を行った。

該結合反応により得られた組み換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、常法によりプラスミドp46-1を取得した。

該プラスミドに含まれるcDNA断片の塩基配列を決定することにより、プラスミドp46-1に、配列番号2に記載された約2.3kbのcDNAが含まれ、該cDNAには1,425bpのオープンリーディングフレーム（以下、ORFと略す）が存在することが分かった。

p46-1の構造を第1図に示す。

該ORFには、配列番号1に記載された475アミノ酸よりなる新規のポリペプチドがコードされていた。

該アミノ酸配列を、解析プログラム[Wisconsin Package Ver9.1 (Genetics Computer Group, 米国)に含まれるBestfit]を用いて既知のヌクレオシドトランスポーターhENT1およびhENT2と比較した。（第2図）

該ポリペプチドとhENT1はアミノ酸配列で35%が一致しており、類似アミノ酸を考慮した場合は48%の相同性を示した。

該ポリペプチドとhENT2はアミノ酸配列で33%が一致しており、類似アミノ酸を考慮した場合は43%の相同性を示した。

また、種々のチャンネル、トランスポーターで基質特異性、輸送活性に膜貫通部位が重要であることが報告されている[FEBS Lett., 413, 142 (1997)、J. Biol. Chem., 269, 14865 (1994)、Biochemistry, 37, 1322 (1998)]。

該ポリペプチドと既知のヌクレオシドトランスポーターの推定される膜貫通領域[Nature Medicine, 3, 89 (1997)]のアミノ酸配列を比較したところ、膜貫通領域と推定される部分において高い相同性を有していた（第3図）。

以上の結果から、該ORFは新規ヌクレオシドトランスポーター（hENTR1）をコードしていると考えられる。

p46-1にコードされる新規トランスポーターhENTR1および既知のヌクレオシドトランスポーターhENT1およびhENT2のアミノ酸配列を基に疎水性プロットを比較した図を示す（第4図）。

実施例2 ノーザンハイブリダイゼーションによるmRNAの発現解析

実施例1で調製したプラスミドpHENT1homologueの15 μ gを10 mM トリスー塩酸 (pH 7.5)、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM ジチオスレイトールからなる緩衝液50 μ lに溶解し、30単位のEcoRI (宝酒造社製)を加え、37℃で4時間消化反応を行った。

該反応液を用い、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、DNA断片を回収した。

該DNA断片の1 μ gを、40 mM トリスー塩酸 (pH 8.0)、6 mM 塩化マグネシウム、2 mM スペルミジン、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP、1 mM CTP、1 mM GTP、0.65 mM UTP、0.35 mM デイゴキシゲニン-11-UTPを含む緩衝液50 μ lに溶解し、40単位のT7 RNAポリメラーゼ (ベーリンガーマンハイム社製)を添加し、37℃で2時間*in vitro*転写反応を行った。

反応後、得られた該反応液より、エタノール沈殿によりデイゴキシゲニン標識cRNAプローブを回収した。

該プローブを用いて、ヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓のpoly(A)⁺ RNAフィルター [Human Multiple Tissue Northern Blotsのフィルター (Clontech社製)] に対して、以下に示す条件に従いノーザンハイブリダイゼーションを行った。

該フィルターを、50%ホルムアミド、5倍濃度のSSC (1倍濃度のSSCの組成は、150 mM 塩化ナトリウムおよび15 mM クエン酸ナトリウムよりなる)、0.5% ドデシル硫酸ナトリウム (以下、SDSと略記する)、2% ブロッキング試薬 (ベーリンガーマンハイム社製)、0.1 mg/ml サケ精子DNAを含む緩衝液 (以下、ハイブリダイゼーションバッファーと略記する)中に浸漬し、70℃で2時間プレハイブリダイゼーションを行った。

該フィルターを、上述のデイゴキシゲニン標識cRNAプローブが1 μ g/m

1 の濃度で溶解しているハイブリダイゼーションバッファーに浸漬し、70℃で15時間ハイブリダイゼーションを行った。

該フィルターを2倍濃度のSSC、0.1% SDSよりなる緩衝液中で70℃、10分間浸漬する条件で1回、0.2倍濃度のSSC、0.1% SDSよりなる緩衝液中で70℃、30分間浸漬する条件で3回洗浄した。

該フィルターを100mM マレイン酸 (pH 7.5)、150mM 塩化ナトリウムよりなる緩衝液 (以下、DIG I 緩衝液と略記する) 中で室温、15分間浸漬する条件で2回洗浄し、SDSを除去した。

該フィルターを100mM マレイン酸 (pH 7.5)、150mM 塩化ナトリウム、1% ブロッキング試薬よりなる緩衝液 (以下、DIG II 緩衝液と略記する) に浸漬し、1時間室温にてブロッキングを行った。

該フィルターを、DIG II 緩衝液で10,000倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ディゴキシゲニン抗体 Fab フラグメント (ベーリンガーマンハイム社製) 溶液中に浸漬し、室温で30分間抗原抗体反応を行った。

該フィルターをDIG I 緩衝液で室温、30分間浸漬する条件で3回洗浄し、余分な抗体を除去した後、100mM トリス-塩酸 (pH 9.0)、100mM 塩化ナトリウム、50mM 塩化マグネシウムからなる緩衝液 (以下、DIG III 緩衝液と略記する) に5分間浸漬し平衡化した。

該フィルターを、DIG III 緩衝液で100倍に希釈した発光基質 CDP-Star (ベーリンガーマンハイム社製) 溶液中に室温で15分間浸漬し、シグナルを発光させ、オートラジオグラフィーで検出した。

結果を第5図に示す。心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓、全ての臓器において約2.4キロヌクレオチドのバンドが認められた。胎盤、脾臓において特に強い発現が認められた。

実施例3 hENT1関連蛋白 (hENTR1) ラットカウンターパート cDNA のクローン化

hENT1[Nature Medicine, 3, 89(1997)]と新規ヌクレオシドトランスポーター hENTR1において保存されているアミノ酸領域を用いて配列番号7および8に示されるdegenerate primerを設計し、合成した。(nはa、c、g、tのいずれか、yはc、tのいずれか、rはa、gのいずれかを示す。)

2種類のプライマー各々1.0 μ M、ラット腎由来mRNAから作成したcDNAライブラリー2 μ l、各成分200 μ MのdNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)混合液、Taq Gold(パーキンエルマー社製)2.5単位および1 \times Taq Gold緩衝液(Mg plus)を含む反応溶液50 μ lを用い、下記条件下でPCRを行なった。

即ち、TaKaRa PCR Thermal Cycler 480を用い、95℃で10分間加熱後、94℃で1分間、50℃で1分間の工程を1サイクルとして30サイクル行い、更に72℃で8分間加熱した。

得られた該PCR反応液より5 μ lを分取し、アガロース電気泳動により予想される約1 kbのDNA断片が増幅されたことを確認後、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてマニュアルに従ってDNA断片を回収した。

上記で回収したDNA断片50 ngおよびpT7Blue(R)T-Vector(Novagen社製)50 ngをDNA ligation kit Ver.2(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合反応を行なった。該反応により得られた組み換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりプラスミドpRENT1-1kbを得た。

制限酵素解析の結果、プラスミドpRENT1-1kbに含まれる挿入DNA断片には BamHI 認識配列が2カ所存在し、挿入DNA断片中から約0.7 kbのDNA断片が切り出されることが判明した。

そこでプラスミドpRENT1-1kb30 μ gを、20 mM トリスー塩酸(pH 8.5)、10 mM 塩化マグネシウム、1 mM ジチオスレイトール、100 mM 塩化カリウムを含む緩衝液50 μ lに溶解し、40単位の BamHI(宝酒造社製)

を加え、37℃で3時間消化反応を行なった。該反応液をアガロース電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてBamHI断片(0.7 kb)のDNA断片を回収した。

該DNA断片を、ECLダイレクト核酸ラベリング・検出システム(Amersham社製)を用いてホースラディッシュスーパーオキシダーゼ標識し、プローブとして用いた。

該プローブを用いてラット腎由来cDNAライブラリー(Clontech社製、商品名: Rat Kidney 5'-STRETCH PLUS cDNA Library) 3×10^5 クローンについて、ブランクハイブリダイゼーションを行ない、プローブにハイブリダイズする6個の独立したファージクローン(ベクター: λ gt11)を得た(クローン3-1、3-2、5-1、6-1、9-2および9-3)。

該ハイブリダイゼーションの操作は、全てECLダイレクト核酸ラベリング・検出システム(Amersham社製)のマニュアルに従って行なった。

該ファージクローンのうちクローン3-2に含まれるcDNA断片を、ファージベクターからプラスミドベクターへ以下の方法で組み換え直した。

該クローンのファージDNA 20 μ gを、50 mM トリスー塩酸(pH 7.5)、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM ジチオスレイトールを含む緩衝液30 μ l中に溶解し、15単位のEcoRI(宝酒造社製)を加え、37℃で4時間消化反応を行った。該反応液をアガロース電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてEcoRI断片(1.7 kb)を回収した。

一方、pBluescript II KS(-)(STRATAGENE社製) 2 μ gを50 mM トリスー塩酸(pH 7.5)、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM ジチオスレイトールを含む緩衝液30 μ l中に溶解し、15単位のEcoRI(宝酒造社製)を加え、37℃で4時間消化反応を行なった。

該反応液をエタノール沈殿し、EcoRI断片(3.0 kb)を回収した。

該DNA断片を50 mM トリスー塩酸(pH 9.0)、1 mM 塩化マグネシウムを含む緩衝液30 μ lに溶解し、0.5単位のアルカリホスファターゼ(E.coli

C75)(宝酒造社製)を加え、60℃で30分間脱リン酸化反応を行った。

該反応液をアガロース電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてEcoRI-アルカリホスファターゼ処理断片(3.0 kb)を回収した。

上記で回収したクローン3-2由来のEcoRI断片(1.7 kb)50 ngおよびpBluescript II KS(-)EcoRI-アルカリホスファターゼ処理断片(3.0 kb)50 ngをDNA ligation kit Ver.2(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合反応を行なった。該反応により得られた組み換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりプラスミドp3-2を得た。プラスミドp3-2構築過程および制限酵素地図を第6図に示す。

該プラスミドに含まれるcDNA断片の塩基配列を決定したところ、プラスミドp3-2には配列番号6に記載された約1.7 kbのcDNAが含まれ、配列番号5に記載されたアミノ酸配列を有する新規ポリペプチド(rENTR1)をコードするオープンリーディングフレームが存在した。

該アミノ酸配列を、解析プログラム[GENETYX WIN ver.2.1(ソフトウェア社製)]を用いて新規ヌクレオシドトランスポーター(hENTR1)と比較したところ、71.8%の一致が認められた。アライメント解析結果を第7図に示す。

実施例4 ノーザンハイブリダイゼーションによるmRNAの発現解析

実施例3で塩基配列を決定したプラスミドpRENT1-1kb10 µgを50 mM トリス-塩酸(pH 7.5)、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM ジチオスレイトールからなる緩衝液50 µlに溶解し、10単位のEcoRV(宝酒造社製)を加え、37℃で4時間消化反応を行なった。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、該DNA断片を10 mM トリス-塩酸(pH 7.5)、10 mM 塩化マグネシウム、1 mM ジチオスレイトールからなる緩衝液50 µlに溶解し、10単位のSacI(宝酒造社製)を加え、37℃で4時間消化反応を行った。該反応液をアガロース電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction kit(QIAGEN社製)を用いてEcoRV-SacI断片(0.4 kb)を精製した。

一方、pGEM-7Zf(+) (Promega社製) 2 μ g を 33 mM トリス-酢酸 (pH 7.9)、10 mM 酢酸マグネシウム、0.5 mM ジチオスレイトール、66 mM 酢酸カリウム、0.01% ウシ血清アルブミンからなる緩衝液 50 μ l に溶解し、10 単位の Sma I (宝酒造社製) を加え、30 $^{\circ}$ C で 4 時間消化反応を行なった。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、該 DNA 断片を 10 mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、10 mM 塩化マグネシウム、1 mM ジチオスレイトールからなる緩衝液 50 μ l に溶解し、10 単位の Sac I (宝酒造社製) を加え、37 $^{\circ}$ C で 4 時間消化反応を行った。該反応液をアガロース電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction kit (QIAGEN社製) を用いて Sma I - Sac I 断片 (3.0 kb) を精製した。

上記で回収したプラスミド pRENT1-1kb 由来の EcoRV - Sac I 断片 (0.4 kb) 50 ng および pGEM-7Zf(+) SmaI - SacI 断片 (3.0 kb) 50 ng を DNA ligation kit Ver.2 (宝酒造社製) を用いてマニュアルに従って結合反応を行なった。該反応により得られた組み換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、常法によりプラスミド pRENT1-Nor を得た。プラスミド pRENT1-Nor の構築過程および制限酵素地図を第 8 図に示す。

調製したプラスミド pRENT1-Nor 10 μ g を 20 mM トリス-塩酸 (pH 8.5)、10 mM 塩化マグネシウム、1 mM ジチオスレイトール、100 mM 塩化カリウムを含む緩衝液 50 μ l に溶解し、30 単位の BamHI (宝酒造社製) を加え、37 $^{\circ}$ C で 3 時間消化反応を行なった。該反応液を用いてフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿を行ない、DNA 断片を回収した。

該 DNA 断片の 1 μ g を、40 mM トリス-塩酸 (pH 8.0)、6 mM 塩化マグネシウム、2 mM スペルミジン、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP、1 mM CTP、1 mM GTP、0.65 mM UTP、0.35 mM ディゴキシゲニン-11-UTP を含む緩衝液 50 μ l に溶解し、40 単位の T7 RNA ポリメラーゼ (ベーリンガーマンハイム社製) を加え、37 $^{\circ}$ C で 2 時間 in vitro 転写反応を行った。

得られた該反応液より、エタノール沈殿によりディゴキシゲニン標識 cRNA

プローブを回収した。

該プローブを用いて、ラットおよびマウス由来の心臓、脳、脾臓、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、精巣のpoly(A)⁺ RNA フィルター [Rat Multiple Tissue Northern Blotsのフィルター(Clontech社製)およびMouse Multiple Tissue Northern Blotsのフィルター(Clontech社製)] に対して、以下に示す条件に従いノーザンハイブリダイゼーションを行った。

該フィルターを、50%ホルムアミド、5倍濃度のSSC(1倍濃度のSSCの組成は、150mM 塩化ナトリウムおよび15mM クエン酸ナトリウムよりなる)、0.5% SDS、2% ブロッキング試薬(ベーリンガー・マンハイム社製)、0.1mg/ml サケ精子DNAを含むハイブリダイゼーションバッファー中に浸漬し、70℃で2時間プレハイブリダイゼーションを行った。

該フィルターを、上述のディゴキシゲニン標識cRNAプローブが1μg/mlの濃度で溶解しているハイブリダイゼーションバッファーに浸漬し、70℃で15時間ハイブリダイゼーションを行った。

該フィルターを2倍濃度のSSC、0.1% SDSよりなる緩衝液中で70℃、10分間浸漬する条件で1回、0.2倍濃度のSSC、0.1% SDSよりなる緩衝液中で70℃、30分間浸漬する条件で3回洗浄した。

該フィルターをDIG I緩衝液中で室温、15分間浸漬する条件で2回洗浄し、SDSを除去した。

該フィルターをDIG II緩衝液に浸漬し、1時間室温にてブロッキングを行った。

該フィルターを、DIG II緩衝液で10,000倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ディゴキシゲニン抗体Fabフラグメント(ベーリンガー・マンハイム社製)溶液中に浸漬し、室温で30分間抗原抗体反応を行った。

該フィルターをDIG I緩衝液で室温、30分間浸漬する条件で3回洗浄し、余分な抗体を除去した後、DIG III緩衝液に5分間浸漬し平衡化した。

該フィルターを、DIG III緩衝液で100倍に希釈した発光基質CDP-Star(ベーリンガー・マンハイム社製)溶液中に室温で15分間浸漬し、シグナル

を発光させ、オートラジオグラフィーで検出した。

ラットの結果を第9図に、マウスの結果を第10図に示す。ラットにおいては約3キロヌクレオチド、マウスにおいては約6キロヌクレオチドの大きさのバンドが認められた。またいずれも腎臓において強い発現が認められた。

産業上の利用可能性

本発明により得られる新規トランスポーターポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNAおよび該ポリペプチドを認識する抗体を用いることにより、哺乳動物用の虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、膵炎または高血圧の予防薬あるいは治療薬、抗ウイルス剤あるいは悪性腫瘍治療薬の作用増強剤、鎮痛薬あるいは血小板凝集阻害薬、または化学療法時の副作用の低減剤を提供することが出来る。

配列表フリーテキスト

配列番号3－人工配列の説明：合成DNA

配列番号4－人工配列の説明：合成DNA

配列番号7－人工配列の説明：合成DNA

配列番号8－人工配列の説明：合成DNA

請求の範囲

1. 配列番号 1 または 5 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。
2. 配列番号 1 または 5 記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつヌクレオシドのトランスポート活性を有するポリペプチド。
3. 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドをコードする DNA。
4. 配列番号 2 または 6 記載の塩基配列を有する DNA。
5. 請求項 3 または 4 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつヌクレオシドのトランスポート活性を有するポリペプチドをコードする DNA。
6. 請求項 3 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA。
7. 組換え体 DNA が、プラスミド p 4 6 - 1 または p 3 - 2 である、請求項 6 記載の組換え体 DNA。
8. 請求項 6 または 7 記載の組換え体 DNA を保有する形質転換体。
9. 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞から選ばれる形質転換体である、請求項 8 記載の形質転換体。
10. 微生物が、Escherichia 属に属する微生物である、請求項 9 記載の形質転換体。
11. Escherichia 属に属する微生物が、Escherichia coli JM109/p46-1 (FERM BP-6462) または Escherichia coli JM109/p3-2 (FERM BP-6830) である、請求項 10 記載の形質転換体。
12. 請求項 8 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドの製造方法。
13. 請求項 3 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の DNA の有する塩基配列中の

連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチド。

14. オリゴヌクレオチド誘導体が、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN 3' - P 5' ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5 プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、DNA中のリボースが2' - O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体およびオリゴヌクレオチド中のリボースが2' - メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチド誘導体である、請求項13記載のオリゴヌクレオチド。

15. 請求項13または14記載のオリゴヌクレオチドを用い、請求項1または2記載のポリペプチドをコードするmRNAを検出する方法。

16. 請求項13または14記載のオリゴヌクレオチドを用い、請求項1または2記載のポリペプチドの発現を抑制する方法。

17. 請求項1または2記載のポリペプチドを認識する抗体。

18. 請求項17記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項1または2記載のポリペプチドの免疫学的検出法または免疫組織染色法。

19. 請求項17記載の抗体を含有する、免疫組織染色剤。

20. 請求項1または2記載のポリペプチドと被験試料とを接触させるこ

とを特徴とする、該ポリペプチドの有するヌクレオシドのトランスポート活性を変動させる化合物のスクリーニング方法。

21. 請求項20記載の方法により得られる化合物。

22. 請求項1または2記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

23. 請求項1または2記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の変動の検出を、請求項15記載の方法を用いて、該ポリペプチドをコードするmRNAを検出することにより行うことを特徴とする、請求項22記載のスクリーニング方法。

24. 請求項1または2記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の変動の検出を、請求項18記載の方法を用いて、該ポリペプチドを検出することにより行うことを特徴とする、請求項22記載のスクリーニング方法。

25. 請求項22～24のいずれか1項に記載の方法により得られる化合物。

26. 請求項1または2記載のポリペプチドを含有する、哺乳動物用の虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、脾炎または高血圧の予防薬または治療薬。

27. 請求項1または2記載のポリペプチドを含有する、哺乳動物用の抗ウイルス剤または悪性腫瘍治療薬の作用増強剤。

28. 請求項1または2記載のポリペプチドを含有する、哺乳動物用の鎮痛薬または血小板凝集阻害薬。

29. 請求項1または2記載のポリペプチドを含有する、哺乳動物用の化学療法時の副作用の低減剤。

30. 請求項13または14記載のオリゴヌクレオチドを含有する、哺乳動物用の虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、脾炎または高血圧の予防薬または治療薬。

31. 請求項13または14記載のオリゴヌクレオチドを含有する、哺乳動物用の抗ウイルス剤または悪性腫瘍治療薬の作用増強剤。

32. 請求項13または14記載のオリゴヌクレオチドを含有する、哺乳動物用の鎮痛薬または血小板凝集阻害薬。

33. 請求項13または14記載のオリゴヌクレオチドを含有する、哺乳動物用の化学療法時の副作用の低減剤。

34. 請求項17記載の抗体を含有する、哺乳動物用の虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、膵炎または高血圧の予防薬または治療薬。

35. 請求項17記載の抗体を含有する、哺乳動物用の抗ウイルス剤または悪性腫瘍治療薬の作用増強剤。

36. 請求項17記載の抗体を含有する、哺乳動物用の鎮痛薬または血小板凝集阻害薬。

37. 請求項17記載の抗体を含有する、哺乳動物用の化学療法時の副作用の低減剤。

38. 哺乳動物がヒトである、請求項26、30および34いずれかに記載の虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、膵炎または高血圧の予防薬または治療薬。

39. 哺乳動物がヒトである、請求項27、31または35いずれかに記載の抗ウイルス剤または悪性腫瘍治療薬の作用増強剤。

40. 哺乳動物がヒトである、請求項28、32または36いずれかに記載の鎮痛薬または血小板凝集阻害薬。

41. 哺乳動物がヒトである、請求項29、33または37いずれかに記載の化学療法時の副作用の低減剤。

42. 請求項1または2記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を司るプロモーターDNA。

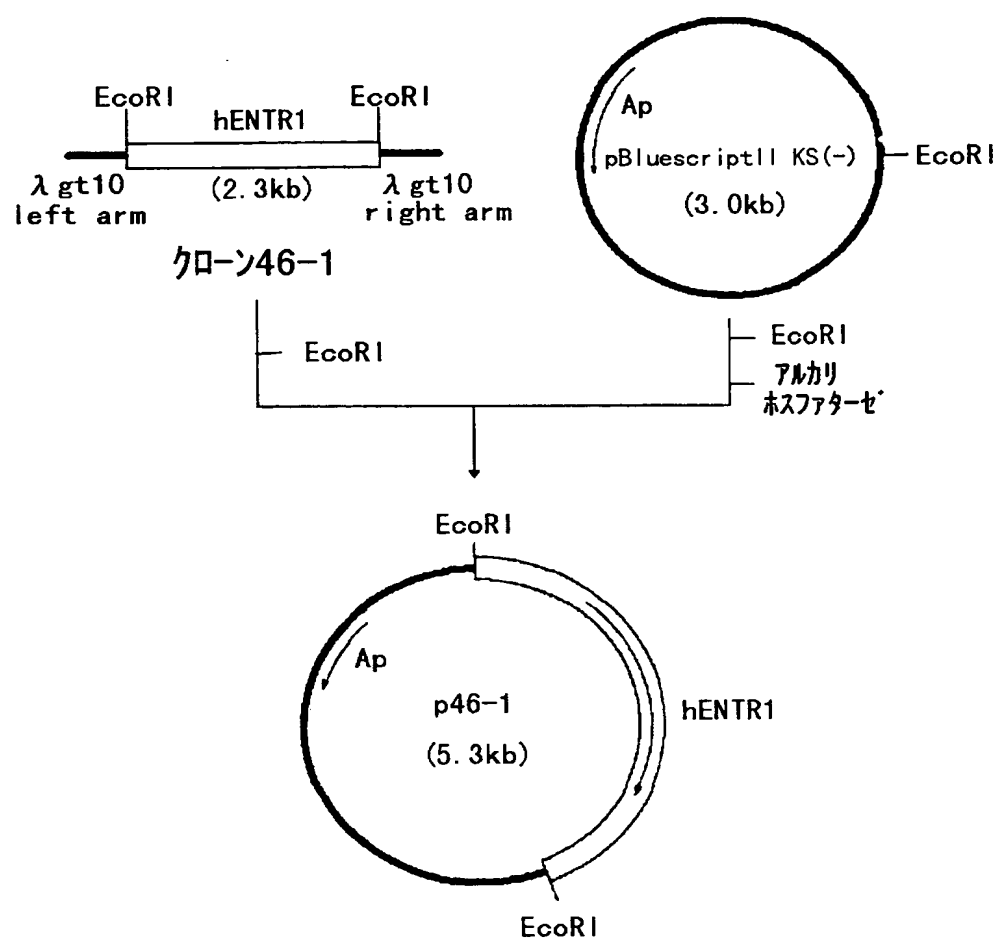
43. 請求項42記載のプロモーターDNAおよび該プロモーターDNA

の下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを保有する形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物含量を測定することを特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法。

44. レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子から選ばれる遺伝子である、請求項43記載のスクリーニング方法。

45. 請求項43または44記載の方法により得られる化合物。

第1図



THIS PAGE BLANK (USPTO)

第2図

hENT1	1:_____	MTTSHQPQDRYKAVWLIFFML	21
hENT2	1:_____	MARGDAPRDSYHLVGISFFIL	21
hENTR1	1:MAVVSDDFQHSSNSTYGTSSSLRADQEALLEKLLDRPPPGLRPEDRFCGTIIFFSL	60	
		* * * * *	
hENT1	22:GLGTLLPWNFFMTATQYFTNRLDMSQNVSLVTAELSKDAQASAAPALPERNSLSAI-F	80	
hENT2	22:GLGTLLPWNFFITAIPYFQARLA_____	GAGNSTARILSTNHTGPEDAFNF	67
hENTR1	61:GIGSLLPWNFFITAKEYWMFKL_____	RNSSPATGEDPEGSDILNYF	103
	* * * * *	* * * * *	
hENT1	81:NNVMILCAMLPLLLFTYLNSTFLHQRIPQSVRIILGSLVAILLVFLITAILVKVQL—DALP	138	
hENT2	68:NNWVTLLSQLPLLLFTLLNSFLYQCVPTVRILGSLLAITLLFALTAALVKVDM—SPGP	125	
hENTR1	104:ESYLAVASTVPSMLCLVANFLLVNRVAHVIRVLASLTVILAIFMVITALVKVDTFSWTRG	163	
	* * * * *	* * * * *	
hENT1	139:FFVTMIKIVLINSFGAILQGSFLGLAGLLPASYTAPIMSGQGLAGFFASVAMICAIASG	198	
hENT2	126:FFSITMASVCFINSFSAVLQGSFLGQLTMPSTYSTLFLSGQGLAGIFAALAMLLSMASG	185	
hENTR1	164:FFAVTIVCMVILSGASTVFSSSIYGMTGSFPMRNSQALISGGAMGGTVSAVASLVDLAAS	223	
	* * * * *	* * * * *	
hENT1	199:SELSESAFGYFITACAVIILTIICYLGLPRLEFYRYQQLK—LEGPGEQETKLDLISKG	256	
hENT2	186:VDAETSALGYFITPCVGIILMSIVCYLSLPHLKFAFYLLANKSSQAQAQELTKAELLQSD	245	
hENTR1	224:SDVRNSALAFFLTATIFLVLCMGLYLLSRLEYARYYMR_____	PVLAHVFSGE	273
	* * * * *	* * * * *	
hENT1	257:EEPRAGK_____	EESGVSVSNSQPTNESHSIKAILKNISVLAFSVCFIFTITI	304
hENT2	246:ENGIPSSPQKVALTLDLDLEKEPESEPDQKPGKPSVFTVFQKIWLTAALCLVLVFTVTL	305	
hENTR1	274:EELPQDSL_____	SAPSVASRFIDSHTPPLRPILKKTASLGFCVTYVFFITS	320
	* * * * *	* * * * *	
hENT1	305:GMFPAVTVEVKSSIAGSSTW—ERYFIPVSCFLTIFNIFDWLGRSLTAVFMWPGKDSRWLP	362	
hENT2	306:SVFPAITAMVTSS—TSPGKW—SQFFNPICFLLFNIMDWLGRSLTSYFLWPDEDSRLLP	362	
hENTR1	321:LIYPAVCTNIESLNKSGSLWTTKFFIPLTTFLLYNFADLCGRQLTAWIQVPGPNSKALP	380	
	* * * * *	* * * * *	
hENT1	363:SLVLARLVFVPLLLCNIPRRYL—TVVFEHDAWFIFMAAFASNGYLASLCMCFGPKK	421	
hENT2	363:LLVCLRFLFVPLFMLCHVPQRSRL—PILFPQDAYFITFMLLFAVSNGYLVSLTMCLAPRQ	421	
hENTR1	381:GFVLLRTCLIPFLVLCNYQPRVHLKTVVFQSDVYPALLSSLLGLSNGYLSTLALLYGPKI	440	
	* * * * *	* * * * *	
hENT1	422:VKPAEAETAGAIMAFFLCLGLALGAVFSFLFRAIV	456	
hENT2	422:VLPHEREVAGALMTFFLALGLSCGASLSFLFKALL	456	
hENTR1	441:VPRELAETGVVMSFYVCLGLTLGSACSTLLVHLI	475	
	* * * * *	* * * * *	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/9

第3図

```

hENT1 -----M TTSHQPQDRY
hENT2 -----M ARGDAPRDSY
hENTR1 MAVSEDDFQ HSSNSTYGGT SSSLRADQEA LLEKLLDRPP PGLQRPEDRF
          * *

hENT1 KAVWLIFFML GLGTLLPWNF FMTATQYFTN RLDMSQNVSL VTAELSKDAQ
hENT2 HLVGISFFIL GLGTLLPWNF FITAIPYFQA RLAGAGN... ..STARI
hENTR1 CGTYIIFSL GIGSLLPWNF FITAKEYWMF KL.....RN
          * * * * *

hENT1 ASAAPAAPLP ERNSLSAIFN NVMTLCAMLP LLLFTYLNSF LHQRIPQSVR
hENT2 LSTNHTGPD AFN.....FN NWVTLLSQLP LLLFTLLNSF LYQCVPETVR
hENTR1 SSSPATGEDP EGSDILNYFE SYLAVASTVP SMLCLVANFL LVNRVAVHIR
          * * * * *

hENT1 ILGSLVAILL VFLITAILVK VQLDALP..F FVITMIKIVL INSGAILQG
hENT2 ILGSLLAILL LFALTAALVK VDMSPGP..F FSITMASVCF INSFSAVLQG
hENTR1 VLASLTVILA IFMVITALVK VDTFSWTRGF FAVTIVCMVI LSGASTVFSS
          * * * * *

hENT1 SLFGLAGLLP ASYTAPIMSG QGLAGFFASV AMICAIASGS ELSESAFGYF
hENT2 SLFGQLGTMF STYSTLFLSG QGLAGIFAAL AMLLSMASGV DAETSALGYF
hENTR1 SIYGMTGSFP MRNSQALISG GAMGGTVSAV ASLVDLAASS DVRNSALAFF
          * * * * *

hENT1 ITACAVIILT IICYLGLPRL EFYRYQQLK LEGPGEQ..E TKLDLISKGE
hENT2 ITPCVGILMS IVCYLSLPHL KFARYYLANK SSQAQAQELE TKAELLQSDE
hENTR1 LTATIFLVLC MGLYLLLSRL EYARYYMR.. ..P VLAHVFSGE
          * * * * *

hENT1 E..PRAGK.. ..EE SGVSVNSQP TNESHSEIKAI LKNISVLAFS
hENT2 NGIPSSPOKV ALTLDLDLEK EPESEPDEPQ KPGKPSVFTV FQKIWLTALE
hENTR1 EELPQDSLSE PSVASRFIDS H.....TPPLRPI LKKTASLGFC

hENT1 VCFIFTITIG MFPAVTVEVK SSIAGSST.W .ERYFIPVSC FLTFNIFDWL
hENT2 LVLVFTVTLV VFPAITAMVT SS.TSPGK.W .SQFFNPICC FLLFNIMDWL
hENTR1 VTYVFFITSL IYPAVCTNIE SLNKGSGSLW TTKFFIPLTT FLLYNFADLC
          * * * * *

hENT1 GRSLTAVFMW PGKDSRWLPS LVLARLVFVP LLLLCNIKPR RYL.TVVFEH
hENT2 GRSLTSYFLW PDERSRLLEPL LVCLRFLFVP LFMLCHVPQR SRL.PILFPQ
hENTR1 GRQLTAWIQV PGPNSKALPG FVLLRTCLIP LFVLCNYQPR VHLKTVVFQS
          * * * * *

hENT1 DAWFIFMAA FAFSNGYLAS LCMCFGPKKV KPAAEATAGA IMAFFLCLGL
hENT2 DAYFITFMLL FAVSNGYLVS LTMCLAPRQV LPHEREVAGA LMTFFLALGL
hENTR1 DVYPALLSSL LGLSNGYLST LALLYGPKIV PRELAEATGV VMSFYVCLGL
          * * * * *

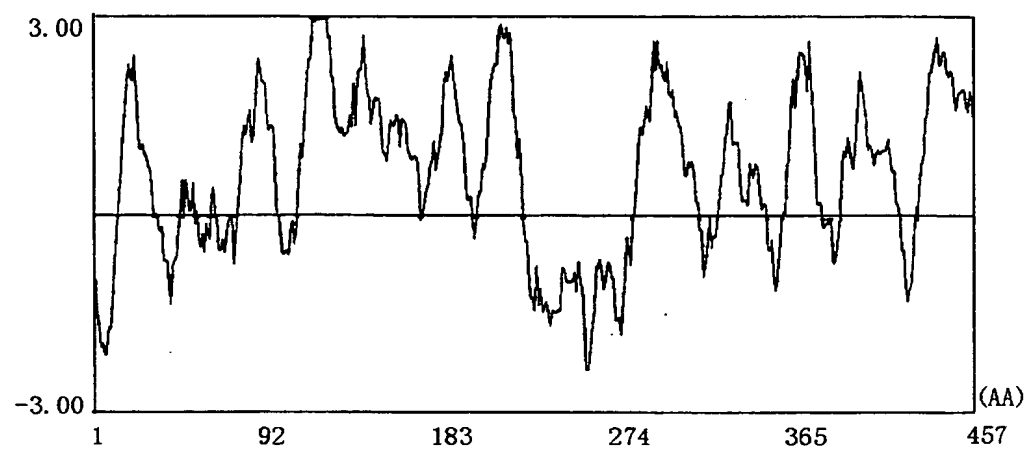
hENT1 ALGAVFSFLF RAIV
hENT2 SCGASLSFLF KALL
hENTR1 TLGSACSTLL VHLI
          * * *

```

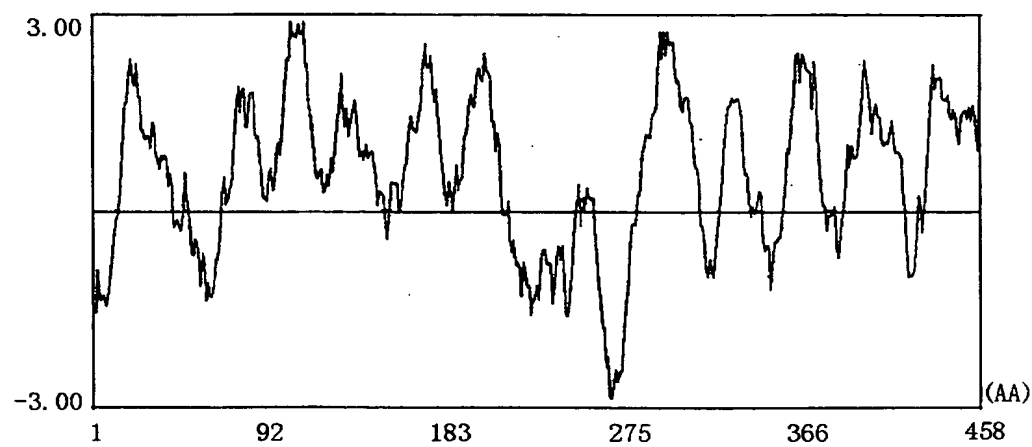
THIS PAGE BLANK (USPTO)

第4図

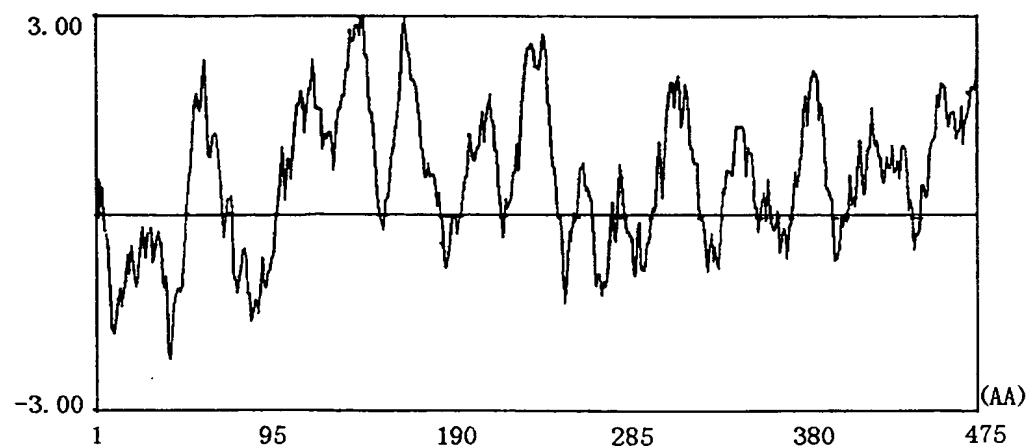
hENT1



hENT2

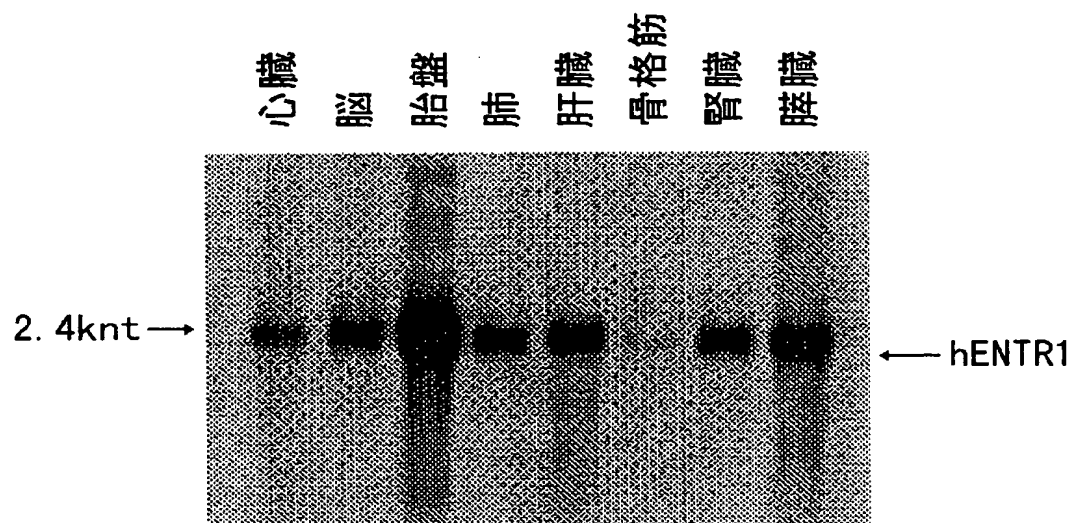


hENTR1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

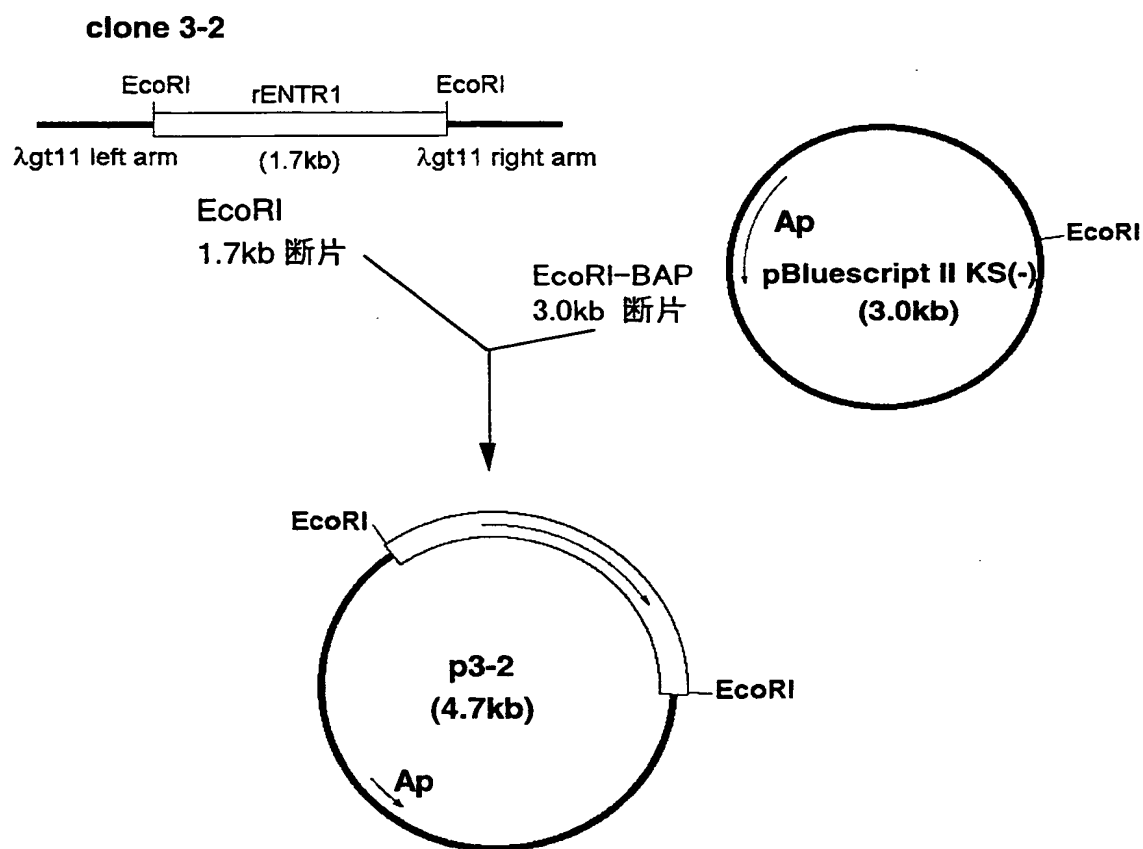
第5図



THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/9

第 6 図



THIS PAGE BLANK (USPTO)


```

hENTR1 MAVVSEDDFQSSNSTYGTSSSLRADQEAALLEKLLDRPPPGQLQRPEDRFCGYIIFFSL
    ** .***      ****. * .*. . *****. * ** *.*****. * .*****. *
rENTR1 MAFASEDIAYHSSNAVYRVPSNRHEADQEALLGKPLDYPAPGLQRPEDRFNGAYIIFFCL

hENTR1 GIGSLLPWNFFITAKEYWMFKLRNSSSPATGEDPEGSdilNYFESYLAVASTVPSMLCLV
    ***.*****.***** *****.*****.***.*****.*****.*****. * **
rENTR1 GIGGLLPWNFFVTAKEYWAFKLRNCSSPASGKDPEDADILNYFESYLAVASTVPSLLFLV

hENTR1 ANFLLVNRVAVHIRVLASLTVILAIFMVITALVKVDTFSWTRGFFAVTIVCMVILSGAST
    *****. **.*****. * *****. ....* .*** *****. ....* .***
rENTR1 ANFLLVNRIRVHVRVLASLSVSLAIFVVMVAVLRVDTSSWTRGFFSIAMACMAIISSST

hENTR1 VFSSSIYGMTGSFPMRNSQALISGGAMGGTVSAVASLVDLAASSDVRNSALAFFLTATIF
    .*.***.***.*****.*****.*****.*****.*****.*****.***
rENTR1 IFNSSVYGLTGSFPMRNAQALISGGAMGGTVSAVASLVDLAASSDVRDSALAFFLTAADF

hENTR1 LVLCMGLYLLLSRLEYARYYMRPVLAHVFSGEEELPQDLSAPSASRFIDSHTPPLRP
    * ** .*****.*****.*****. *****. * . * . * .*****. *****
rENTR1 LGLCVGLYLLLPQLEYARYYMRPVVPIHVFSSEDSPPRDAPSTSSVAPASRAVHTPPLGP

hENTR1 ILKKTASLGFcvTYVFFITSLIYPACVNIESLNKGSGLWTTKFFIPLTTFLLYNFADL
    *****.***. ....* .***.***. ....* .***. ....* .***. ....* .***
rENTR1 ILKKTAGLGFCAVFLYFITALIFPAISTNIQPMHKG TGSPWTSKFYVPLTVFLLNFADL

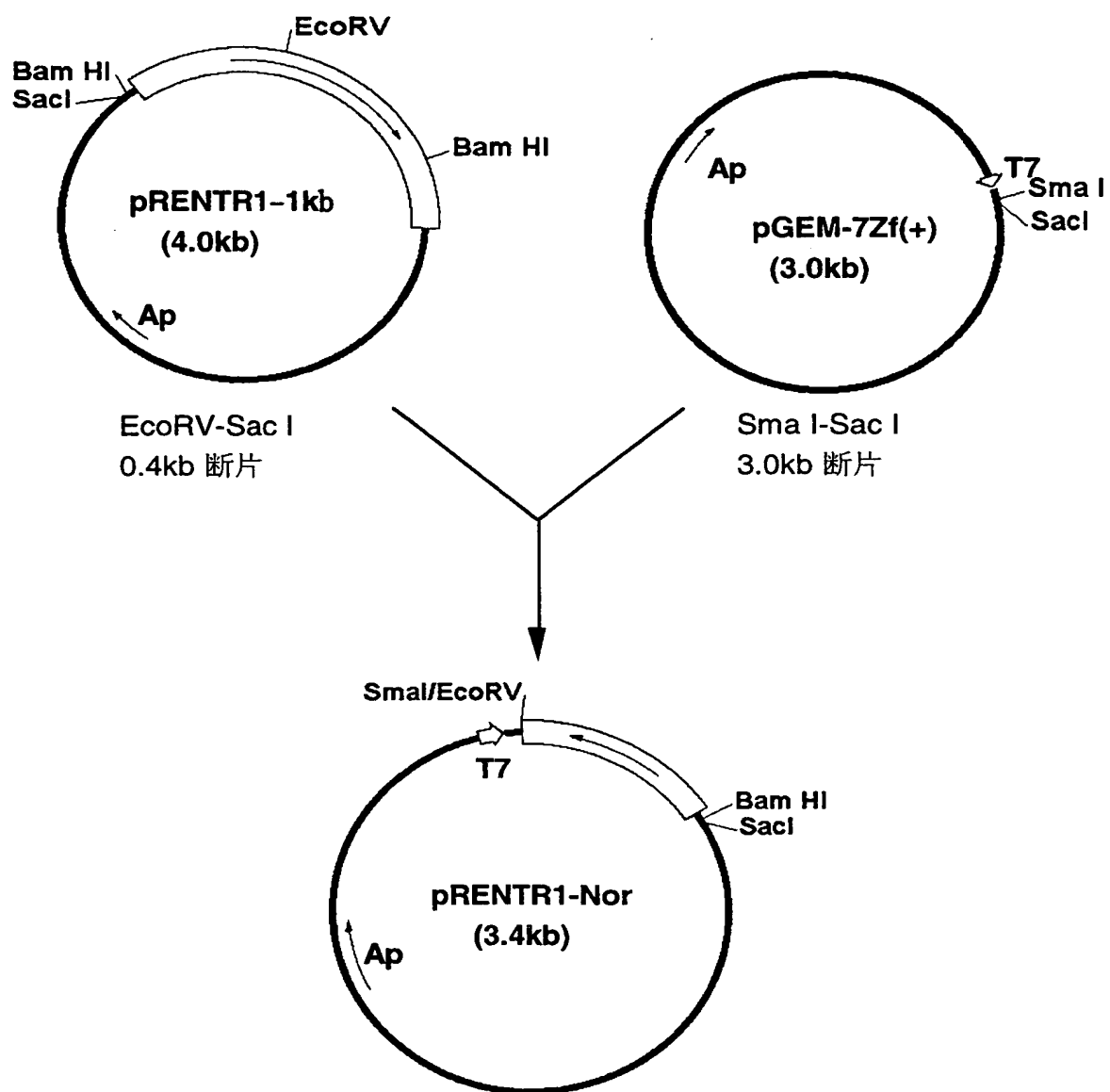
hENTR1 CGRQLTAWIQVPGPNKALPGFVLLRTCLIPFLVCNYPQVRHLKTVVFQSDVPALLSS
    ****.*****.*** ** ... *.***.***.***** ** . * .*****.*** ...
rENTR1 CGRQVTAWIQVPGPRSKLLPILAVSRVCLVPLFLCNYPQPRSHLTLVLFQSDIYPILFTC

hENTR1 LLGLSNGYLSTLALLYGPKIVPRELAEATGVVMSFYVCLGLTLGSACSTLLVHLI
    *****. * .*****.*****.*** ** ...* *****. ....* .*
rENTR1 LLGLSNGYLSTLVLMYGPKIVPRELAEATSVVMLFYMSLGLMLGSACAALLEHFI

```

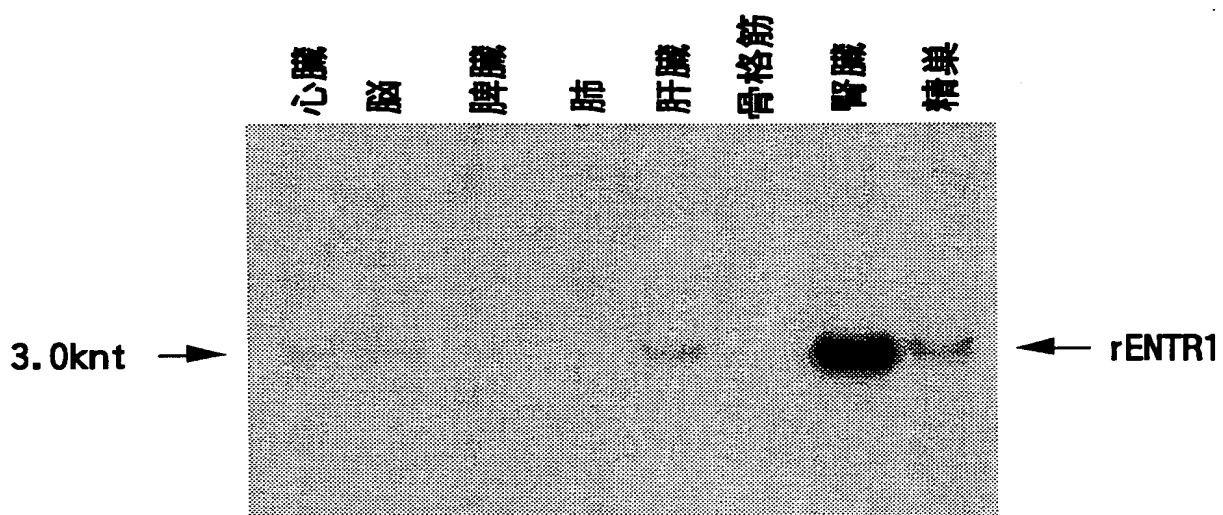
THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 8 図

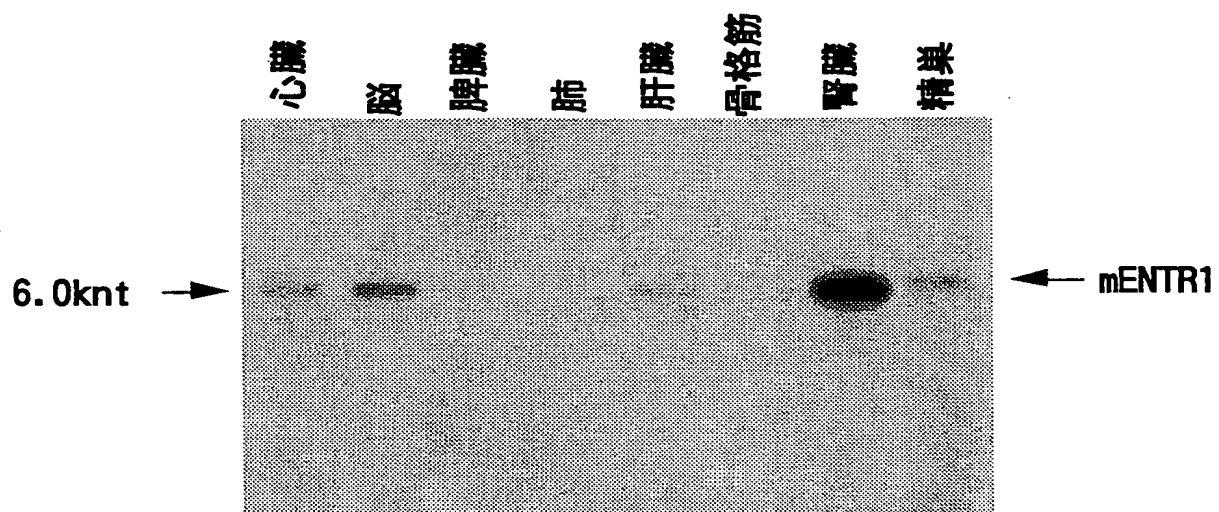


THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 9 図



第 10 図



THIS PAGE BLANK (USPTO)

配 列 表

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,

<120> NOVEL POLYPEPTIDE

<130> 11152W01

<150> JP H10-241248

<151> 1998-08-27

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 475

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Val Val Ser Glu Asp Asp Phe Gln His Ser Ser Asn Ser Thr

1

5

10

15

Tyr Gly Thr Thr Ser Ser Ser Leu Arg Ala Asp Gln Glu Ala Leu Leu

20

25

30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Glu Lys Leu Leu Asp Arg Pro Pro Pro Gly Leu Gln Arg Pro Glu Asp

35

40

45

Arg Phe Cys Gly Thr Tyr Ile Ile Phe Phe Ser Leu Gly Ile Gly Ser

50

55

60

Leu Leu Pro Trp Asn Phe Phe Ile Thr Ala Lys Glu Tyr Trp Met Phe

65

70

75

80

Lys Leu Arg Asn Ser Ser Ser Pro Ala Thr Gly Glu Asp Pro Glu Gly

85

90

95

Ser Asp Ile Leu Asn Tyr Phe Glu Ser Tyr Leu Ala Val Ala Ser Thr

100

105

110

Val Pro Ser Met Leu Cys Leu Val Ala Asn Phe Leu Leu Val Asn Arg

115

120

125

Val Ala Val His Ile Arg Val Leu Ala Ser Leu Thr Val Ile Leu Ala

130

135

140

Ile Phe Met Val Ile Thr Ala Leu Val Lys Val Asp Thr Phe Ser Trp

145

150

155

160

Thr Arg Gly Phe Phe Ala Val Thr Ile Val Cys Met Val Ile Leu Ser

165

170

175

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3.

Gly Ala Ser Thr Val Phe Ser Ser Ser Ile Tyr Gly Met Thr Gly Ser

180

185

190

Phe Pro Met Arg Asn Ser Gln Ala Leu Ile Ser Gly Gly Ala Met Gly

195

200

205

Gly Thr Val Ser Ala Val Ala Ser Leu Val Asp Leu Ala Ala Ser Ser

210

215

220

Asp Val Arg Asn Ser Ala Leu Ala Phe Phe Leu Thr Ala Thr Ile Phe

225

230

235

240

Leu Val Leu Cys Met Gly Leu Tyr Leu Leu Leu Ser Arg Leu Glu Tyr

245

250

255

Ala Arg Tyr Tyr Met Arg Pro Val Leu Ala Ala His Val Phe Ser Gly

260

265

270

Glu Glu Glu Leu Pro Gln Asp Ser Leu Ser Ala Pro Ser Val Ala Ser

275

280

285

Arg Phe Ile Asp Ser His Thr Pro Pro Leu Arg Pro Ile Leu Lys Lys

290

295

300

Thr Ala Ser Leu Gly Phe Cys Val Thr Tyr Val Phe Phe Ile Thr Ser

305

310

315

320

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Leu Ile Tyr Pro Ala Val Cys Thr Asn Ile Glu Ser Leu Asn Lys Gly

325

330

335

Ser Gly Ser Leu Trp Thr Thr Lys Phe Phe Ile Pro Leu Thr Thr Phe

340

345

350

Leu Leu Tyr Asn Phe Ala Asp Leu Cys Gly Arg Gln Leu Thr Ala Trp

355

360

365

Ile Gln Val Pro Gly Pro Asn Ser Lys Ala Leu Pro Gly Phe Val Leu

370

375

380

Leu Arg Thr Cys Leu Ile Pro Leu Phe Val Leu Cys Asn Tyr Gln Pro

385

390

395

400

Arg Val His Leu Lys Thr Val Val Phe Gln Ser Asp Val Tyr Pro Ala

405

410

415

Leu Leu Ser Ser Leu Leu Gly Leu Ser Asn Gly Tyr Leu Ser Thr Leu

420

425

430

Ala Leu Leu Tyr Gly Pro Lys Ile Val Pro Arg Glu Leu Ala Glu Ala

435

440

445

Thr Gly Val Val Met Ser Phe Tyr Val Cys Leu Gly Leu Thr Leu Gly

450

455

460

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ser Ala Cys Ser Thr Leu Leu Val His Leu Ile

465

470

475

<210> 2

<211> 2240

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (24)..(1451)

<400> 2

cggcggcgtg ggcagcggc gac atg gcc gtt gtc tca gag gac gac ttt cag 53

Met Ala Val Val Ser Glu Asp Asp Phe Gln

1

5

10

cac agt tca aac tcc acc tac gga acc aca agc agc agt ctc cga gct 101

His Ser Ser Asn Ser Thr Tyr Gly Thr Thr Ser Ser Ser Leu Arg Ala

15

20

25

gac cag gag gca ctg ctt gag aag ctg ctg gac cgc ccg ccc cct ggc 149

Asp Gln Glu Ala Leu Leu Glu Lys Leu Leu Asp Arg Pro Pro Pro Gly

30

35

40

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6.

ctg cag agg ccc gag gac cgc ttc tgt ggc aca tac atc atc ttc ttc 197

Leu Gln Arg Pro Glu Asp Arg Phe Cys Gly Thr Tyr Ile Ile Phe Phe

45

50

55

agc ctg ggc att ggc agt cta ctg cca tgg aac ttc ttt atc act gcc 245

Ser Leu Gly Ile Gly Ser Leu Leu Pro Trp Asn Phe Phe Ile Thr Ala

60

65

70

aag gag tac tgg atg ttc aaa ctc cgc aac tcc tcc agc cca gcc acc 293

Lys Glu Tyr Trp Met Phe Lys Leu Arg Asn Ser Ser Ser Pro Ala Thr

75

80

85

90

ggg gag gac cct gag ggc tca gac atc ctg aac tac ttt gag agc tac 341

Gly Glu Asp Pro Glu Gly Ser Asp Ile Leu Asn Tyr Phe Glu Ser Tyr

95

100

105

ctt gcc gtt gcc tcc acc gtg ccc tcc atg ctg tgc ctg gtg gcc aac 389

Leu Ala Val Ala Ser Thr Val Pro Ser Met Leu Cys Leu Val Ala Asn

110

115

120

ttc ctg ctt gtc aac agg gtt gca gtc cac atc cgt gtc ctg gcc tca 437

Phe Leu Leu Val Asn Arg Val Ala Val His Ile Arg Val Leu Ala Ser

125

130

135

ctg acg gtc atc ctg gcc atc ttc atg gtg ata act gca ctg gtg aag 485

Leu Thr Val Ile Leu Ala Ile Phe Met Val Ile Thr Ala Leu Val Lys

140

145

150

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gtg gac act ttc tcc tgg acc cgt ggc ttt ttt gcg gtc acc att gtc 533
Val Asp Thr Phe Ser Trp Thr Arg Gly Phe Phe Ala Val Thr Ile Val
155 160 165 170

tgc atg gtg atc ctc agc ggt gcc tcc act gtc ttc agc agc agc atc 581
Cys Met Val Ile Leu Ser Gly Ala Ser Thr Val Phe Ser Ser Ser Ile
175 180 185

tac ggc atg acc ggc tcc ttt cct atg agg aac tcc cag gca ctg ata 629
Tyr Gly Met Thr Gly Ser Phe Pro Met Arg Asn Ser Gln Ala Leu Ile
190 195 200

tca gga gga gcc atg ggc ggg acg gtc agc gcc gtg gcc tca ttg gtg 677
Ser Gly Gly Ala Met Gly Gly Thr Val Ser Ala Val Ala Ser Leu Val
205 210 215

gac ttg gct gca tcc agt gat gtg agg aac agc gcc ctg gcc ttc ttc 725
Asp Leu Ala Ala Ser Ser Asp Val Arg Asn Ser Ala Leu Ala Phe Phe
220 225 230

ctg acg gcc acc atc ttc ctc gtg ctc tgc atg gga ctc tac ctg ctg 773
Leu Thr Ala Thr Ile Phe Leu Val Leu Cys Met Gly Leu Tyr Leu Leu
235 240 245 250

ctg tcc agg ctg gag tat gcc agg tac tac atg agg cct gtt ctt gcg 821
Leu Ser Arg Leu Glu Tyr Ala Arg Tyr Tyr Met Arg Pro Val Leu Ala

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8.

255

260

265

gcc cat gtg ttt tct ggt gaa gag gag ctt ccc cag gac tcc ctc agt 869

Ala His Val Phe Ser Gly Glu Glu Glu Leu Pro Gln Asp Ser Leu Ser

270

275

280

gcc cct tcg gtg gcc tcc aga ttc att gat tcc cac aca ccc cct ctc 917

Ala Pro Ser Val Ala Ser Arg Phe Ile Asp Ser His Thr Pro Pro Leu

285

290

295

cgc ccc atc ctg aag aag acg gcc agc ctg ggc ttc tgt gtc acc tac 965

Arg Pro Ile Leu Lys Lys Thr Ala Ser Leu Gly Phe Cys Val Thr Tyr

300

305

310

gtc ttc ttc atc acc agc ctc atc tac ccc gcc gtc tgc acc aac atc 1013

Val Phe Phe Ile Thr Ser Leu Ile Tyr Pro Ala Val Cys Thr Asn Ile

315

320

325

330

gag tcc ctc aac aag ggc tcg ggc tca ctg tgg acc acc aag ttt ttc 1061

Glu Ser Leu Asn Lys Gly Ser Gly Ser Leu Trp Thr Thr Lys Phe Phe

335

340

345

atc ccc ctc act acc ttc ctc ctg tac aac ttt gct gac cta tgt ggc 1109

Ile Pro Leu Thr Thr Phe Leu Leu Tyr Asn Phe Ala Asp Leu Cys Gly

350

355

360

cgg cag ctc acc gcc tgg atc cag gtg cca ggg ccc aat agc aag gcg 1157

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9.

Arg Gln Leu Thr Ala Trp Ile Gln Val Pro Gly Pro Asn Ser Lys Ala

365

370

375

ctc cca ggg ttc gtg ctc ctc cgg acc tgc ctc atc ccc ctc ttc gtg 1205

Leu Pro Gly Phe Val Leu Leu Arg Thr Cys Leu Ile Pro Leu Phe Val

380

385

390

ctc tgt aac tac cag ccc cgc gtc cac ctg aag act gtg gtc ttc cag 1253

Leu Cys Asn Tyr Gln Pro Arg Val His Leu Lys Thr Val Val Phe Gln

395

400

405

410

tcc gat gtg tac ccc gca ctc ctc agc tcc ctg ctg ggg ctc agc aac 1301

Ser Asp Val Tyr Pro Ala Leu Leu Ser Ser Leu Leu Gly Leu Ser Asn

415

420

425

ggc tac ctc agc acc ctg gcc ctc ctc tac ggg cct aag att gtg ccc 1349

Gly Tyr Leu Ser Thr Leu Ala Leu Leu Tyr Gly Pro Lys Ile Val Pro

430

435

440

agg gag ctg gct gag gcc acg gga gtg gtg atg tcc ttt tat gtg tgc 1397

Arg Glu Leu Ala Glu Ala Thr Gly Val Val Met Ser Phe Tyr Val Cys

445

450

455

ttg ggc tta aca ctg ggc tca gcc tgc tct acc ctc ctg gtg cac ctc 1445

Leu Gly Leu Thr Leu Gly Ser Ala Cys Ser Thr Leu Leu Val His Leu

460

465

470

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10.

atc tag aagggaggac acaaggacat tgggtgcttca gagcctttga agatgagaag 1501

Ile

475

agagtgcagg agggctgggg gccatggagg aaaggcctaa agtttcactt ggggacagag 1561

agcagagcac actcgggcct catccctccc aagatgccag tgagccacgt ccatgccccat 1621

tccgtgcaag gcagatatc cagtcattt aacagaacac tcctgagaca gttgaagaag 1681

aaatagcaca aatcaggggt actcccttca cagctgatgg ttaacattcc accttctttc 1741

tagcccttca aagatgctgc cagtgttcgc cctagagtta ttacaaagcc agtgccaaaa 1801

cccagccatg ggctctttgc aacctcccag ctgcgctcat tccagctgac agcgagatgc 1861

aagcaaagtc tcagctctcc ttaccctgaa ggggtctccc tggaatggaa gtcccctggc 1921

atggtcagtc ctcaggccca agactcaagt gtgcacagac ccctgtgttc tgtgggtgaa 1981

caactgcca ctaaccagac tggaaaaccc agaaagatgg gccttccatg aatgcttcat 2041

tccagaggga ccagagggcc tccctgtgca agggatcaag catgtctggc ctgggttttc 2101

aaaaaaagag ggatcctcat gacctggtgg tctatggcct ggggtcaagat gagggctttt 2161

cagtgttcct gtttacaaca tgtcaaagcc attggttcaa gggcgtaata aatacttgcg 2221

THIS PAGE BLANK (USPTO)

tattcaaaaa aaaaaaaaaa

2240

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 3

actttgctga cctacgtggc

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 4

tacgcccttg aaccaatggc

20

<210> 5

<211> 475

THIS PAGE BLANK (USPTO)

12

<212> PRT

<213> Rat

<400> 5

Met Ala Phe Ala Ser Glu Asp Ile Ala Tyr His Ser Ser Asn Ala Val
1 5 10 15

Tyr Arg Val Pro Ser Asn Arg His Glu Ala Asp Gln Glu Ala Leu Leu
20 25 30

Gly Lys Pro Leu Asp Tyr Pro Ala Pro Gly Leu Gln Arg Pro Glu Asp
35 40 45

Arg Phe Asn Gly Ala Tyr Ile Ile Phe Phe Cys Leu Gly Ile Gly Gly
50 55 60

Leu Leu Pro Trp Asn Phe Phe Val Thr Ala Lys Glu Tyr Trp Ala Phe
65 70 75 80

Lys Leu Arg Asn Cys Ser Ser Pro Ala Ser Gly Lys Asp Pro Glu Asp
85 90 95

Ala Asp Ile Leu Asn Tyr Phe Glu Ser Tyr Leu Ala Val Ala Ser Thr
100 105 110

Val Pro Ser Leu Leu Phe Leu Val Ala Asn Phe Leu Leu Val Asn Arg
115 120 125

Ile Arg Val His Val Arg Val Leu Ala Ser Leu Ser Val Ser Leu Ala
130 135 140

THIS PAGE BLANK (USPTO)

13.

Ile Phe Val Val Met Ala Val Leu Val Arg Val Asp Thr Ser Ser Trp
145 150 155 160

Thr Arg Gly Phe Phe Ser Ile Ala Met Ala Cys Met Ala Ile Ile Ser
165 170 175

Ser Ser Ser Thr Ile Phe Asn Ser Ser Val Tyr Gly Leu Thr Gly Ser
180 185 190

Phe Pro Met Arg Asn Ala Gln Ala Leu Ile Ser Gly Gly Ala Met Gly
195 200 205

Gly Thr Val Ser Ala Val Ala Ser Leu Val Asp Leu Ala Ala Ser Ser
210 215 220

Asp Val Arg Asp Ser Ala Leu Ala Phe Phe Leu Thr Ala Ala Val Phe
225 230 235 240

Leu Gly Leu Cys Val Gly Leu Tyr Leu Leu Leu Pro Gln Leu Glu Tyr
245 250 255

Ala Arg Tyr Tyr Met Arg Pro Val Val Pro Ile His Val Phe Ser Ser
260 265 270

Glu Asp Ser Pro Pro Arg Asp Ala Pro Ser Thr Ser Ser Val Ala Pro
275 280 285

Ala Ser Arg Ala Val His Thr Pro Pro Leu Gly Pro Ile Leu Lys Lys
290 295 300

Thr Ala Gly Leu Gly Phe Cys Ala Val Phe Leu Tyr Phe Ile Thr Ala
305 310 315 320

THIS PAGE BLANK (USPTO)

14

Leu Ile Phe Pro Ala Ile Ser Thr Asn Ile Gln Pro Met His Lys Gly
325 330 335

Thr Gly Ser Pro Trp Thr Ser Lys Phe Tyr Val Pro Leu Thr Val Phe
340 345 350

Leu Leu Phe Asn Phe Ala Asp Leu Cys Gly Arg Gln Val Thr Ala Trp
355 360 365

Ile Gln Val Pro Gly Pro Arg Ser Lys Leu Leu Pro Ile Leu Ala Val
370 375 380

Ser Arg Val Cys Leu Val Pro Leu Phe Leu Leu Cys Asn Tyr Gln Pro
385 390 395 400

Arg Ser His Leu Thr Leu Val Leu Phe Gln Ser Asp Ile Tyr Pro Ile
405 410 415

Leu Phe Thr Cys Leu Leu Gly Leu Ser Asn Gly Tyr Leu Ser Thr Leu
420 425 430

Val Leu Met Tyr Gly Pro Lys Ile Val Pro Arg Glu Leu Ala Glu Ala
435 440 445

Thr Ser Val Val Met Leu Phe Tyr Met Ser Leu Gly Leu Met Leu Gly
450 455 460

Ser Ala Cys Ala Ala Leu Leu Glu His Phe Ile
465 470 475

THIS PAGE BLANK (USPTO)

15

<210> 6

<211> 1734

<212> DNA

<213> Rat

<220>

<221> CDS

<222> (12)..(1436)

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 6

gcggcagcga c atg gcc ttt gcc tct gag gac att gca tac cac agc tca 50

Met Ala Phe Ala Ser Glu Asp Ile Ala Tyr His Ser Ser

1 5 10

aat gct gtc tac aga gtc cca agc aac cgt cat gaa gct gac cag gaa 98

Asn Ala Val Tyr Arg Val Pro Ser Asn Arg His Glu Ala Asp Gln Glu

15 20 25

gcc cta ctg gga aaa cca cta gac tac cca gcc cca ggc ctg cag agg 146

Ala Leu Leu Gly Lys Pro Leu Asp Tyr Pro Ala Pro Gly Leu Gln Arg

30 35 40 45

cca gag gac cgc ttc aat ggt gcc tat atc atc ttc ttc tgc ctg gga 194

Pro Glu Asp Arg Phe Asn Gly Ala Tyr Ile Ile Phe Phe Cys Leu Gly

50 55 60

att ggc ggc cta cta ccc tgg aac ttt ttt gtc act gcc aaa gag tac 242

Ile Gly Gly Leu Leu Pro Trp Asn Phe Phe Val Thr Ala Lys Glu Tyr

65 70 75

tgg gca ttt aaa ctc cga aac tgc tcc agc cca gcc tcc ggg aag gac 290

Trp Ala Phe Lys Leu Arg Asn Cys Ser Ser Pro Ala Ser Gly Lys Asp

THIS PAGE BLANK (USPTO)

16.

80

85

90

cca gag gat gca gac atc ctg aac tac ttt gag agc tac ctg gcg gtt 338
 Pro Glu Asp Ala Asp Ile Leu Asn Tyr Phe Glu Ser Tyr Leu Ala Val
 95 100 105

gct tcc act gtg cct tcc ctg ctg ttt ctg gtg gct aac ttc ctg ctt 386
 Ala Ser Thr Val Pro Ser Leu Leu Phe Leu Val Ala Asn Phe Leu Leu
 110 115 120 125

gtc aac agg atc cgg gtg cat gtc cga gtt ctg gcc tca ctg tcc gtc 434
 Val Asn Arg Ile Arg Val His Val Arg Val Leu Ala Ser Leu Ser Val
 130 135 140

tcc ctg gcc atc ttt gtg gtt atg gcc gtg ctg gtg agg gtg gac act 482
 Ser Leu Ala Ile Phe Val Val Met Ala Val Leu Val Arg Val Asp Thr
 145 150 155

tct tcc tgg acc cgg ggc ttc ttc agc atc gcc atg gcg tgc atg gcc 530
 Ser Ser Trp Thr Arg Gly Phe Phe Ser Ile Ala Met Ala Cys Met Ala
 160 165 170

atc atc agc agc tcc tcc acc atc ttc aat agc agc gtg tat ggc ctg 578
 Ile Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ile Phe Asn Ser Ser Val Tyr Gly Leu
 175 180 185

acg ggc tcg ttc ccc atg agg aat gcc cag gca ctg ata tca gga gga 626
 Thr Gly Ser Phe Pro Met Arg Asn Ala Gln Ala Leu Ile Ser Gly Gly
 190 195 200 205

gcc atg gga ggg aca gtc agc gcc gtg gcc tcc ctg gtg gac ctg gca 674
 Ala Met Gly Gly Thr Val Ser Ala Val Ala Ser Leu Val Asp Leu Ala
 210 215 220

gca tcc agt gac gtg cga gac agt gcg ctg gcc ttc ttc ctc aca gca 722
 Ala Ser Ser Asp Val Arg Asp Ser Ala Leu Ala Phe Phe Leu Thr Ala
 225 230 235

THIS PAGE BLANK (USPTO)

17.

gca gtc ttc ctt ggg ctc tgt gtg ggg ctc tac cta ctg ctg ccc caa	770
Ala Val Phe Leu Gly Leu Cys Val Gly Leu Tyr Leu Leu Leu Pro Gln	
240 245 250	
ctg gag tat gcc agg tac tac atg agg ccg gtt gtc cca atc cac gtg	818
Leu Glu Tyr Ala Arg Tyr Tyr Met Arg Pro Val Val Pro Ile His Val	
255 260 265	
ttt tct agt gaa gac agc cca ccc cgg gat gct ccc agc acc tcc tcc	866
Phe Ser Ser Glu Asp Ser Pro Pro Arg Asp Ala Pro Ser Thr Ser Ser	
270 275 280 285	
gtg gcc cct gca tcc aga gca gtg cac acg cca ccc ctc gga ccc atc	914
Val Ala Pro Ala Ser Arg Ala Val His Thr Pro Pro Leu Gly Pro Ile	
290 295 300	
ctg aag aag aca gct ggc ctg ggg ttc tgc gcc gtt ttc ctc tac ttc	962
Leu Lys Lys Thr Ala Gly Leu Gly Phe Cys Ala Val Phe Leu Tyr Phe	
305 310 315	
atc acc gcc ctt atc ttc ccc gct atc tcc acc aac atc cag ccc atg	1010
Ile Thr Ala Leu Ile Phe Pro Ala Ile Ser Thr Asn Ile Gln Pro Met	
320 325 330	
cac aag ggc acc ggc tct cca tgg acc tcc aag ttc tat gtg ccc ctc	1058
His Lys Gly Thr Gly Ser Pro Trp Thr Ser Lys Phe Tyr Val Pro Leu	
335 340 345	
acc gtc ttc ctc ctt ttc aac ttt gct gac ctc tgc ggc cga cag gtc	1106
Thr Val Phe Leu Leu Phe Asn Phe Ala Asp Leu Cys Gly Arg Gln Val	
350 355 360 365	
aca gcc tgg atc cag gtg cca ggt cct agg agc aag ctg ctc ccc ata	1154
Thr Ala Trp Ile Gln Val Pro Gly Pro Arg Ser Lys Leu Leu Pro Ile	
370 375 380	
ctg gca gtc tct cgc gtc tgc ctc gtg cct ctc ttc ctg ctc tgt aac	1202
Leu Ala Val Ser Arg Val Cys Leu Val Pro Leu Phe Leu Leu Cys Asn	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

18.

385

390

395

tac cag cca cgc tca cac ctg act ctg gtg ctt ttc cag tct gac atc 1250
 Tyr Gln Pro Arg Ser His Leu Thr Leu Val Leu Phe Gln Ser Asp Ile
 400 405 410

tac cct ata ctc ttc acc tgc ctc ttg ggg ctc agt aat ggc tac ctc 1298
 Tyr Pro Ile Leu Phe Thr Cys Leu Leu Gly Leu Ser Asn Gly Tyr Leu
 415 420 425

agc acg ctg gtg ctc atg tat ggg ccc aag att gtg ccc cgg gag ctg 1346
 Ser Thr Leu Val Leu Met Tyr Gly Pro Lys Ile Val Pro Arg Glu Leu
 430 435 440 445

gct gag gcc acc agt gtg gtg atg ctg ttc tac atg tca ctg ggt ttg 1394
 Ala Glu Ala Thr Ser Val Val Met Leu Phe Tyr Met Ser Leu Gly Leu
 450 455 460

atg ctg ggc tca gcc tgt gcg gcc ttg ctt gag cac ttt atc taggagggg 1445
 Met Leu Gly Ser Ala Cys Ala Ala Leu Leu Glu His Phe Ile
 465 470 475

cggcaaggat gtgggttctg tgtgagtgtg tgtggtttgg gtccctggga cctggacagg 1505
 gtgagccgag gtctcatggc gttaagcaag gggttgggtgt ttgcttgat gtacagcaga 1565
 gccactcag actgtctttc tctcagacac atccttgac atcttgttca aggagacatt 1625
 ccagacacag ccagcatgg tggtcacac ctgtaatccc agcattcaag aggctggagc 1685
 tagaggactg ctgtgagttc aaggccagcc tggctccata gtaaaaccc 1734

<210> 7

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

19.

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 7

arrtancrt tact

14

<210> 8

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 8

ytnccntgga acttttt

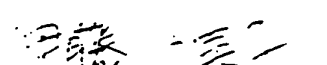
17


THIS PAGE BLANK (USPTO)

出願人又は代理人の書類記号	1152	国際出願番号	
---------------	------	--------	--

寄託された微生物に関する表示
(PCT規則13の2)

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。	
13	頁、 21 行
B. 寄託の表示	他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>
寄託機関の名称 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所	
寄託機関のあて名 (郵便番号及び国名を含む)	
日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305-8566)	
寄託の日付	受託番号
05.08.99	FERM BP-6830
C. 追加の表示 (該当しない場合には記載しない)	この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>
<p>ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である (Rule 28 (4) EPC)。</p>	
D. この表示を行うための指定国 (すべての指定国のために行わない場合)	
E. 追加事項の表示の提出 (該当しない場合には記載しない)	
下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。(例えば「受託番号」のように表示事項を明記する)	

— 受理官庁記入欄 —	
<input checked="" type="checkbox"/>	この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員	
	

— 国際事務局記入欄 —	
<input type="checkbox"/>	この用紙が国際事務局に受理された日
13 SEP 1999	
権限のある職員	
	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

出願人又は代理人の書類記号

1152

国際出願番号

寄託された微生物に関する表示

(PCT規則13の2)

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。

13 頁、 10 行

B. 寄託の表示

他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

寄託機関のあて名 (郵便番号及び国名を含む)

日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305-8566)

寄託の日付

18.08.98

受託番号

FERM BP-6462

C. 追加の表示 (該当しない場合には記載しない)

この情報は別紙に続いている ☐

ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である (Rule 28 (4) EPC)。

D. この表示を行うための指定国 (すべての指定国のために行わない場合)

E. 追加事項の表示の提出 (該当しない場合には記載しない)

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。(例えば「受託番号」のように表示事項を明記する)

受理官庁記入欄

☒ この用紙は国際出願とともに受理した

権限のある職員

伊藤 久美子

様式PCT/RO/134 (1992年7月)

国際事務局記入欄

☐ この用紙が国際事務局に受理された日

13 SEP 1999

権限のある職員

逢 進

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04602

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C07K 14/47, C12N 15/12, C12N 1/21, C12N 5/10, C12P 21/02, C12Q 1/68,
C07K 16/18, G01N 33/15, G01N 33/53, A61K 38/16, A61K 48/00,
A61K 39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C07K 14/47, C12N 15/12, C12N 1/21, C12N 5/10, C12P 21/02, C12Q 1/68,
C07K 16/18, G01N 33/15, G01N 33/53, A61K 38/16, A61K 48/00,
A61K 39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
GenBank/EMBL/DDBJ, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GRIFFITHS, M. et al. "Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs", Nature Medicine (1997), Vol. 3, No. 1, pages 89-93	1-45
A	YAO, S. Y. et al. "Molecular cloning and functional characterization of nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive(es) and NBMPR-insensitive(ei) equilibrative nucleoside transporter proteins (rENT1 and rENT2) from rat tissues", J. Biol. Chem. (1997), Vol. 272, No. 45, pages 28423-28430	1-45
A	GRIFFITHS, M. et al. "Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive(ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta", Biochem. J. (1997), Vol. 628, Pt.3, pages 739-743	1-45

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 November, 1999 (18.11.99)

Date of mailing of the international search report
30 November, 1999 (30.11.99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04602

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CRAWFORD, C. R. et al., "Cloning of the human equilibrative, nitrobenzylmercaptapurine riboside (NBMPR) -insensitive nucleoside transporter ei by functional expression in a transport-deficient cell line", J. Biol. Chem. (February, 1998. Feb) Vol. 273, No. 9, pages 5288-5293	1-45
A	WO, 98/29437, A1 (UNIV. ALBERTA), 09 July, 1998 (09.07.98) & AU, 9857756, A	1-45
P, A	WO, 98/46749, A1 (ST. JUDE CHILDREN'S RES. HOSPITAL), 22 October, 1998 (22.10.98) & AU, 9871096, A	1-45
A	GRIFFITH, D. A. et al. "Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells", Biochim. Biophys. Acta (1996), Vol. 1286, No. 3, pages 153-181	1-45

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C07K 14/47, C12N 15/12, C12N 1/21, C12N 5/10, C12P 21/02, C12Q 1/68, C07K 16/18, G01N 33/15, G01N 33/53, A61K 38/16, A61K 48/00, A61K 39/395

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C07K 14/47, C12N 15/12, C12N 1/21, C12N 5/10, C12P 21/02, C12Q 1/68, C07K 16/18, G01N 33/15, G01N 33/53, A61K 38/16, A61K 48/00, A61K 39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
GenBank/EMBL/DBJ, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	GRIFFITHS, M. et al. "Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs", Nature Medicine (1997) Vol. 3, No. 1, p. 89-93	1-45
A	YAO, S. Y. et al. "Molecular cloning and functional characterization of nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive(es) and NBMPR-insensitive(ei) equilibrative nucleoside transporter proteins (rENT1 and rENT2) from rat tissues", J. Biol. Chem. (1997) Vol. 272, No. 45, p. 28423-28430	1-45

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 11. 99

国際調査報告の発送日

30.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	GRIFFITHS, M. et al. "Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive(ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta", Biochem. J. (1997) Vol. 628, Pt. 3, p. 739-743	1-45
A	CRAWFORD, C. R. et al. "Cloning of the human equilibrative, nitrobenzylmercaptapurine riboside(NBMPR)-insensitive nucleoside transporter ei by functional expression in a transport-deficient cell line", J. Biol. Chem. (1998. Feb.) Vol. 273, No. 9, p. 5288-5293	1-45
A	WO, 98/29437, A1 (UNIV. ALBERTA) 09. 7月. 1998 (09. 07. 98) & AU, 9857756, A	1-45
P, A	WO, 98/46749, A1 (ST. JUDE CHILDREN'S RES. HOSPITAL) 22. 10月. 1998 (22. 10. 98) & AU, 9871096, A	1-45
A	GRIFFITH, D. A. et al. "Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells", Biochim. Biophys. Acta (1996) Vol. 1286, No. 3, p. 153-181	1-45

**PThis Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)